

# Università degli Studi Federico II di Napoli



**Dottorato di Ricerca in Biologia Applicata**

**XXIII ciclo (2007-2010)**

**Risposte fisiologiche e metaboliche in *Chlorella*  
*sorokiniana* in seguito a esposizione a metalli pesanti**

***Tutore:***

Ch.ma Prof. Vincenza Vona

***Candidato:***

Dott. Nicola Lanza

***Coordinatore:***

Ch.mo Prof. Ezio Ricca

# Indice

## Capitolo 1

### Introduzione

<b>1.1 Premessa</b>	<b>pag.7</b>
<b>1.2 Metalli pesanti</b>	<b>pag.11</b>
<b>1.3 Piombo</b>	<b>pag.12</b>
<b>1.4 Cadmio</b>	<b>pag.14</b>
<b>1.5 Microalghe</b>	<b>pag. 15</b>
<b>1.6 Metalli pesanti e metabolismo cellulare</b>	<b>pag.16</b>
<b>1.7 Stress e metabolismo dello zolfo</b>	<b>pag 21</b>
<b>1.8 Scopo della ricerca</b>	<b>pag.23</b>

## **Capitolo 2**

### **Materiali e metodi**

<b>2.1 Coltivazione delle alghe</b>	<b>pag.25</b>
<b>2.2 Metalli pesanti</b>	<b>pag.27</b>
<b>2.3 Determinazione del PCV</b>	<b>pag.27</b>
<b>2.4 Misure di fotosintesi e respirazione</b>	<b>pag.27</b>
<b>2.5 Misura della clorofilla totale e della clorofilla a</b>	<b>pag.28</b>
<b>2.6 Determinazione delle proteine solubili</b>	<b>pag.29</b>
<b>2.7 Preparazione dell'estratto crudo per l'OASTL</b>	<b>pag.29</b>
<b>2.8 Determinazione dell'attività dell'OASTL</b>	<b>pag.30</b>
<b>2.9 Preparazione dell'estratto crudo per l'APX</b>	<b>pag.31</b>
<b>2.10 Determinazione dell'attività dell'APX</b>	<b>pag.32</b>
<b>2.11 Microscopia elettronica a trasmissione (TEM)</b>	<b>pag.34</b>
<b>2.12 Analisi statistica</b>	<b>pag.35</b>

## **Capitolo 3**

### **Risultati**

<b>3.1 Effetto del cadmio sulla velocità di fotosintesi</b>	<b>pag.37</b>
<b>3.2 Effetto del cadmio sulla velocità di respirazione</b>	<b>pag.38</b>
<b>3.3 Effetto del piombo sulla velocità di fotosintesi</b>	<b>pag.43</b>
<b>3.4 Effetto del piombo sulla velocità di respirazione</b>	<b>pag.44</b>
<b>3.5 Effetto del piombo e del cadmio sulla concentrazione dei pigmenti fotosintetici</b>	<b>pag.48</b>
<b>3.6 Crescita cellulare</b>	<b>pag.50</b>
<b>3.7 Effetto del piombo e del cadmio sulla concentrazione delle proteine solubili totali</b>	<b>pag.51</b>
<b>3.8 Attività dell'ascorbato perossidasi</b>	<b>pag.53</b>
<b>3.9 Attività dell'O-acetilserina(tio)lasi</b>	<b>pag.54</b>
<b>3.10 Variazioni ultrastrutturali</b>	<b>pag.56</b>

## **Capitolo 4**

**Discussione**

**pag.60**

**Bibliografia**

**pag.68**

# *Introduzione*

## 1.1 Premessa

L'inquinamento da metalli pesanti è uno dei principali problemi che minacciano la salute della vegetazione, della fauna e degli esseri umani (Singh et al., 1997; Taiz e Zeiger, 1998). Questo è il risultato del rapido sviluppo industriale che si è verificato negli ultimi decenni, a causa del quale, vari rifiuti contenenti ioni di metalli pesanti, sono direttamente immessi nell'ambiente, minacciando la vita degli organismi in generale e delle specie vegetali acquatiche in particolare (Wang, 2002). In aggiunta all'azione antropica, sono da considerare fonte di inquinamento da metalli pesanti, anche l'erosione di alcuni tipi di rocce e di suolo (Ward, 1989). La biodisponibilità, l'accumulo e la tossicità dei metalli pesanti nell'ambiente acquatico dipendono da numerosi fattori come il pH e lo stato di ossidazione del metallo stesso (Pawlik-Skowronska, 2001; Pawlik-Skowronska, 2002), la temperatura dell'acqua, la sua salinità e la concentrazione di altri metalli pesanti, in particolare del ferro (Fe) (Wahben, 1984; Ward, 1989). In studi su alghe marine, *Sargassum sp.*, *Padina sp.*, *Ulva sp.*, *Gracilaria sp.*, la biodisponibilità di alcuni metalli pesanti è stata influenzata dal pH. Infatti attraverso esperimenti di cinetica il valore di pH al quale il piombo e il rame venivano adsorbiti più velocemente è stato pari a 5, mentre per cadmio, zinco e nickel è stato

pari a 5,5 (Sheng et al., 2004). Questo risultato è un'ulteriore conferma dell'evidenza di come, alcuni parametri fisici e chimici dell'ambiente, influiscono sulla loro biodisponibilità e sul loro bioaccumulo. La capacità delle alghe di assorbire i metalli pesanti è attribuita principalmente alla parete cellulare che si compone di fibre di cellulosa, immerse in una matrice amorfa a costituzione prevalentemente polisaccaridica. Nella parete cellulare delle alghe brune (*Phaeophyta*) sono presenti anche altri componenti importanti quali, alginati e alcuni polisaccaridi solfatati come il *Fucoidan*. Sheng et al. (2004), hanno osservato che gli alginati hanno un'alta affinità per i cationi bivalenti; il bioassorbimento dei cationi trivalenti nella parete cellulare, invece, è stato attribuito principalmente alla presenza dei polisaccaridi solfatati. I meccanismi d'assorbimento dei cationi dei metalli pesanti nella parete cellulare, sono indipendenti dal metabolismo della cellula; essi si basano essenzialmente su interazioni fisico-chimiche tra il metallo ed i gruppi funzionali presenti in essa. Proprio per questa indipendenza dal metabolismo cellulare, questo processo è molto veloce (Delgado et al., 1998; Bustard et al., 1997) e per lo più reversibile (Veglio e Beolchini, 1997). Viceversa, il bioaccumulo dei metalli stessi, che inizia con l'azione chelante e successivo immagazzinamento nel vacuolo da parte di molecole specifiche, dipende



dal metabolismo e pertanto è molto più lento e può essere inibito o perlomeno rallentato, dalla temperatura o dalla mancanza di fonti di energia come la luce (Genter, 1996; Cho et al., 1999). L'azione tossica che i metalli pesanti esercitano nei confronti della cellula, si manifesta quando essi sono presenti ad una concentrazione superiore a quella fisiologica. In *Zostera marina*, il grado di tossicità mostrato dai metalli pesanti a cui è stata esposta è : Hg>Cu>Cd>Zn>Cr>Pb (Lyngby e Brix, 1984), mentre in *Stipulacea Halophila* la tossicità è : Pb>Zn>Cu>Cd (Malea, 1994). Questi dati dimostrano che, benché tutti i metalli pesanti siano tossici per gli organismi vegetali, vi è una scala di tossicità riferita alla specie considerata. Quando la concentrazione extracellulare degli ioni dei metalli pesanti è superiore a quella intracellulare, tali ioni possono entrare nella cellula attraverso la membrana. A tal proposito, diversi meccanismi sono stati suggeriti per spiegare questo ingresso, ricordiamo il *mimetismo molecolare*, ossia l'ingresso attraverso gli stessi trasportatori utilizzati da altre specie ioniche come il calcio e per endocitosi (Lebrun, 1999; Cobbett 2000; Moenne, 2002; Van O set al., 2002; Zalups e Ahmad, 2003). I meccanismi utilizzati dalle piante superiori e dalle microalghe per proteggere le cellule dall'eccesso di metalli pesanti, non sono del tutto chiari, tuttavia sono noti l'azione chelante e la compartimentazione

vacuolare, nonché la produzione di proteine da shock termico ( Salt et al., 1998; Cobbett, 2000; Hall, 2002). In seguito all'immissione di metalli pesanti nell'ambiente, in quello acquatico in particolare, le specie che sono in possesso di meccanismi fisiologici quali l'esclusione molecolare, la compartimentazione vacuolare e la sintesi di fitochelatine, saranno in grado di fronteggiare tale stress abiotico in maniera più efficace rispetto alle specie che ne sono sprovviste (Kneer and Zenk, 1992). Negli organismi vegetali, sottoposti a stress da metalli pesanti, la tossicità di questi ultimi è causata dalla produzione di radicali idrossili ( $\text{HO} \cdot$ ) e di perossido di idrogeno ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ), molecole altamente reattive in grado di ossidare le molecole biologiche come proteine, lipidi, polisaccaridi ed acidi nucleici, provocando danni che portano alla morte cellulare mediante necrosi o apoptosi (Hammond-Kosack and Jones, 1996; Briat and Lebrun 1999).

## 1.2 Metalli pesanti

Con la denominazione di metalli pesanti sono identificati gli elementi chimici che presentano densità superiore a  $5,0 \text{ g/cm}^3$  e numero atomico superiore a 20, bassa solubilità dei loro idrati ed elevata tendenza a formare composti complessi. Esistono principalmente come cationi, e possono assumere diversi stati di ossidazione a seconda delle condizioni di pH ed  $E_h$ . In genere, nei più bassi stati di ossidazione, sono ioni monoatomici (es.  $\text{Cr}^{3+}$ ), mentre formano legami covalenti con l'ossigeno ai più elevati stati d'ossidazione (es.  $\text{CrO}_4^{2-}$ ). Inoltre, numerosi metalli pesanti hanno elevata affinità per i gruppi tiolici, amminici, fosforici e carbossilici della sostanza organica ed hanno quindi un'elevata tendenza a combinarsi stabilmente con i siti più reattivi dei composti chimici costituenti la materia vivente (He *et al.*, 2000; Payne, 1998).

Sono considerati metalli pesanti i seguenti elementi:

Alluminio, Ferro, Argento, Bario, Berillio, Cadmio, Cobalto, Cromo, Manganese, Mercurio, Molibdeno, Nickel, Piombo, Rame, Stagno, Titanio, Tallio, Vanadio, Zinco ed alcuni metalloidi con proprietà simili a quelle dei metalli pesanti, quali Arsenico, Bismuto e Selenio. Alcuni tra questi, per esempio Ferro, Rame, Manganese, Selenio, Zinco, sono essenziali per

mantenere il metabolismo degli organismi vegetali. Tuttavia, a concentrazioni più alte sono considerati potenzialmente tossici.

Quando raggiungono concentrazioni cellulari sufficientemente alte, i metalli pesanti interferiscono con il processo biologico della sintesi proteica favorendo la produzione di enzimi con struttura modificata e che pertanto non possono svolgere le loro funzioni biologiche (Payne *et al.*,1998). I metalli pesanti interferiscono anche con altri processi vitali quali, per esempio, il ciclo di Krebs e la sintesi degli Steroidi.

### 1.3 Piombo

L'atomo di piombo (appartenente al gruppo IVA degli elementi della Tavola Periodica) ha configurazione esterna  $4F^{14}5D^{10}6S^26P^2$ . Il suo stato di ossidazione è +4 ( $Pb^{++++}$ ) e +2 ( $Pb^{++}$ ). E' un metallo pesante duttile e malleabile di colore grigio-blu con riflessi azzurrognoli ed è brillante come l'argento, ma se esposto all'aria si ricopre subito di uno strato di ossido. Ha una ridotta consistenza tanto da poterlo piegare con l'unghia. Esso si trova in minerali quali la galena, sotto forma di solfuro di piombo, l'anglesite e la cerussite. Questo metallo viene utilizzato soprattutto nella produzione di plastiche, di vernici, di smalti, di batterie, di accumulatori

per autovetture, di piastre per la salvaguardia contro le radiazioni nucleari, di ceramiche, di pitture, di munizioni e leghe.

L'inquinamento ambientale da piombo deriva soprattutto dagli scarichi dei veicoli a motore, in particolare dai prodotti di combustione della benzina, come ad esempio i composti organici piombo-alcilici, quali il piombo tetrametile e il tetraetile –  $\text{Pb}(\text{C}_2\text{H}_5)_4$  – che erano addizionati alle benzine come antidetonanti; o dagli scarichi industriali come quelli delle fonderie.

Tali attività rilasciano nell'atmosfera composti volatili del Pb, che mediante precipitazioni secche ed umide, favoriscono l'accumulo di Pb nel suolo e nelle acque. Tale fenomeno è favorito anche dal dilavamento dei suoli agricoli, che porta tale contaminante nei corpi idrici, provocando fenomeni di accumulo lungo le catene trofiche. Di norma, nell'acqua il piombo si trova sotto forma di complessi. Gli effetti tossici di questo metallo in acqua sono condizionati dalla presenza di sostanze chelanti, dal pH e dalla durezza dell'acqua stessa. Il piombo perviene nell'acqua soprattutto come conseguenza dell'inquinamento atmosferico e non è un metallo essenziale per la vita.

## 1.4 Cadmio

L'atomo di cadmio (appartenente al gruppo IIB degli elementi di transizione della Tavola Periodica) presenta gli orbitali 4d saturi (con 10 elettroni) ed ha 2 elettroni nell'orbitale 5s. Il suo stato di ossidazione è +2 ( $\text{Cd}^{++}$ ). Il cadmio è insolubile in acqua e i suoi sali si dissociano poco in soluzione. Esso ha effetti tossici su tutti gli organismi, e sull'uomo, è stato addirittura evidenziato un ruolo cancerogeno. Il cadmio si trova nell'ambiente di solito sotto forma di  $\text{CdS}$  e  $\text{CdCO}_3$ , raramente come composto puro, e a concentrazioni che normalmente non sono causa di tossicità acuta. Presenza di Cd è stata accertata anche in miniere di piombo, zinco e ferro.

Fonti di inquinamento sono gli inceneritori, i depositi di spazzatura, il fumo di sigaretta, le industrie chimiche o petrolchimiche, siderurgiche, i rifiuti urbani, la combustione del carbonio, i settori della galvanoplastica, delle vernici e dei coloranti (Alloway, 1995). Il cadmio quando è assorbito da un organismo, vegetale o animale, si lega alle molecole organiche formando legami con l'azoto e lo zolfo compromettendo la funzionalità delle proteine (Okamura e Aoyama, 1994). Tuttavia il suo effetto più evidente sulle piante sembra essere a livello della fotosintesi, come

dimostrato da studi di fluorescenza e misure della concentrazione della clorofilla..

## **1.5 Microalghe**

Le microalghe, insieme ai cianobatteri, sono organismi unicellulari fotoautotrofi. Negli ambienti acquatici, esse sono i produttori primari e costituiscono il primo anello della catena trofica degli ecosistemi marini, garantendo il flusso di materia ed energia necessario per il mantenimento degli organismi eterotrofi.

Le alghe hanno cellule di tipo eucariotico, presentano un diverso corredo di pigmenti fotosintetici (soprattutto clorofilla e carotenoidi), e possiedono sostanze di riserva e componenti parietali del tutto specifici, che possono essere utilizzati come elementi utili per stabilire la loro posizione sistematica.

## 1.6 Metalli pesanti e metabolismo cellulare

Gli organismi vegetali esposti ad alte concentrazioni di metalli pesanti, tendono ad accumulare nei loro tessuti tali metalli (Salt et al.,1995). Quando la loro concentrazione intracellulare supera un valore soglia, si osserva una diminuzione della crescita e della riproduzione dell'organismo esposto (Cobbett, 2000; Hall, 2002), come anche fotoinibizione in piante superiori e alghe esposte a rame e piombo. Gli effetti di un determinato metallo variano da specie a specie, il rame agisce a livello delle membrane tilacoidali, alterandone la struttura e, inoltre, può sostituirsi all'atomo di magnesio della clorofilla con conseguente rallentamento della velocità della fotosintesi ( Stiborova et al., 1986; Angel et al., 1994; Noustakas et al., 1994; Gupta e Singhal, 1995; Stiborova et al.,1996; Singh et al., 1997; Szalontai et al., 1999; Vinit-Dunand et al., 2002). Anche il piombo é in grado di danneggiare le membrane tilacoidali, con gravi ripercussioni sul processo fotosintetico (Heng et al., 2004). Nell'alga verde *Stigeoclonium Kutz* esposta a concentrazioni subletali di zinco (Zn), il contenuto di clorofilla diminuiva notevolmente (Pawlik-Skowronska, 2002). La riduzione della velocità di fotosintesi in cellule algali in presenza di sostanze tossiche può essere dovuta all'inibizione della sintesi di clorofilla *a*, (Wong and Chang,1988).



Una risposta a breve termine negli organismi vegetali, sembra sia l'incremento della sintesi di proteine da shock termico (Hsp) (Tseng et al., 1993; Neumann et al., 1999; Hall, 2002). Queste proteine sembra abbiano il compito di proteggere le membrane cellulari dai danni di perossidazione causati dal metallo (Hall, 2002). La tossicità dei metalli pesanti è ascrivibile allo stress di tipo ossidativo (Pinto et al., 2003). I metalli pesanti possono alterare, nelle alghe, l'equilibrio ossidativo fisiologico, e indurre la sintesi del sistema di difesa antiossidante rappresentato da enzimi quali la superossido dismutasi (SOD), la catalasi (CAT), l'ascorbato perossidasi (APX), la monodeidroascorbato reduttasi (MDHAR) e deidroascorbato reduttasi (DHAR) (Rice-Evans et al., 1996). Queste difese possono anche coinvolgere gli antiossidanti idrosolubili come ascorbato (ASC), glutathione (GSH), composti fenolici e molecole idrosolubili come carotenoidi e tocoferoli (Foyer, Lelandais and Kunert, 1994; Hodges et al., 1997; Hodges and Forney, 2000; Pastori, Foyer and Mullineaux, 2000). I cloroplasti contengono due isoforme della superossido dismutasi (SOD): CuZnSOD, contenente zinco e rame, e FeSOD, che contiene ferro; la superossido dismutasi catalizza la dismutazione di  $O_2^{\bullet-}$  in  $H_2O_2$ , mentre l'ascorbato perossidasi (APX) riduce il perossido d'idrogeno ( $H_2O_2$ ), tossico, in  $H_2O$  (Fridovich, 1997). La

riduzione del perossido d'idrogeno è associata all'ossidazione dell'ascorbato che produce deidroascorbato normalmente ridotto dalla deidroascorbato reduttasi (DHAR) con produzione di glutathione ossidato, che è ridotto da una reduttasi con consumo di NADPH. L'accoppiamento delle reazioni catalizzate dagli enzimi ascorbato perossidasi (APX), glutathione reduttasi (GR) e deidroascorbato reduttasi (DHAR), negli organismi vegetali è chiamato ciclo di Halliwell-Asada e la sua funzione è di disintossicare la cellula dal perossido di idrogeno ( $H_2O_2$ ) attraverso il consumo di NADPH. Pertanto sembra probabile che siano proprio l'ascorbato ed il glutathione a giocare un ruolo chiave nel tamponare gli effetti dello stress ossidativo nella maggior parte dei sistemi eucariotici (Noctor and Foyer, 1998; Smirnoff, 2000; Smirnoff, Conklin and Loewus, 2001). Sono disponibili pochi studi riguardanti i meccanismi di tolleranza ai metalli pesanti nelle alghe. Per esempio è conosciuto il ruolo che ha il rame ( $Cu^{2+}$ ) nell'attivare l'ascorbato perossidasi (APX) in *Selenastrum capricornutum* (Sauser, Liu and Wong, 1997) ed in *Ulva lactuca* (Jervis, Rees-Naesborg and Brown, 1997). Inoltre, rame, mercurio, piombo e cadmio inducono l'attivazione dell'ascorbato perossidasi (APX) e della superossido dismutasi (SOD) e un aumento dei livelli della perossidazione lipidica in cloroplasti isolati dalla microalga *Gonyaulax Polyedra*

(Okamodo et al., 2001). Il grado di ossidazione dei lipidi e delle proteine nelle cellule algali, indica l'entità dello stress (Okamoto et al., 1996). Lo stress di tipo ossidativo danneggia il cloroplasto. Quest'ultimo è particolarmente sensibile alle alte concentrazioni di ioni metallici e specie reattive dell'ossigeno (Foyer, 1996). I cloroplasti essendo costituiti da un sistema di membrane ricco di acidi grassi polinsaturi, sono potenziali obiettivi di perossidazione (Halliwell e Gutteridge, 1999). In condizioni normali queste molecole (ROS) manifestano il loro effetto tossico con estrema lentezza, ma questa azione può essere accelerata dalla presenza di molecole xenobiotiche, come i metalli pesanti o da fattori ambientali, come la luce o l'esposizione a raggi UV. Un altro meccanismo di difesa contro gli effetti tossici dei metalli pesanti, è rappresentato dalla produzione di prolina (Pro), amminoacido a struttura ciclica con funzioni osmoprotettive. Infatti l'accumulo di prolina è associato alla prevenzione dei danni alle membrane ed alle proteine da parte dei metalli pesanti (Shah e Dubey, 1998). Oltre ad influire negativamente sulla fotosintesi, i metalli pesanti inibiscono anche la crescita cellulare (Carr et al., 1998). L'inibizione della crescita delle microalghe è legata sia alla quantità di metallo presente nella cellula (Franklin et al., 2000; 2002a; Ma et al., 2003), sia alla sua natura chimica (Tripathi e Gaur, 2006). Tuttavia, per lo

zinco (Zn) l'inibizione della crescita cellulare è correlata non tanto alla sua concentrazione intracellulare, bensì a quella extracellulare (Wilde et al., 2006). Esso può competere con l'assorbimento degli ioni calcio necessari per la divisione cellulare (Stauber e Florence, 1990). Questo effetto è stato osservato in colture di *Scenedesmus subspicatus* e *Chlamydomonas reinhardtii*, in cui concentrazioni di zinco (Zn) subletali, inibivano la loro velocità di crescita (Knauer et al., 1997). I metalli pesanti provocano anche alterazioni ultrastrutturali. Il cadmio induce drastici cambiamenti morfometrici in cellule di *Chlamydomonas acidophila*, insieme ad aumento del numero e delle dimensione dei vacuoli e dei granuli di amido, nonché la presenza di depositi densi agli elettroni (Nishikawa et al., 2002). Tali variazioni sono state riscontrate anche in cellule di *Chlorella vulgaris* in cui si è osservato un accumulo di granuli di amido e riduzione delle dimensioni dei mitocondri (Wong et al., 1994). I mitocondri, infatti, sono il bersaglio primario dell'azione tossica del cadmio (Silverberg, 1976).

## 1.7 Stress e metabolismo dello zolfo

Lo zolfo è un nutriente essenziale per la crescita delle piante che lo utilizzano prevalentemente per la sintesi di due amminoacidi, cisteina (Cys) e metionina (Met), e di numerosi metaboliti derivanti da questi amminoacidi.

In presenza di basse concentrazioni di solfato nel mezzo di crescita, i livelli di Cys e glutathione (GSH) nei tessuti della pianta diminuiscono drasticamente e ciò porta all'induzione dei sistemi di trasporto del solfato e degli enzimi chiave che ne controllano il suo metabolismo (Lappartient e Touraine 1996; Lappartient et al., 1999). L'assimilazione del  $\text{SO}_4^{2-}$  viene regolata al fine di mantenere un livello ottimale di cisteina nella cellula, data l'importanza biologica di questo amminoacido nella risposta all'adattamento o l'acclimatazione verso forme diverse di stress.

Il glutathione e le fitochelatine sono molecole contenenti cisteina pertanto la loro sintesi è correlata al metabolismo dello zolfo.

La prima tappa della sintesi della cisteina viene realizzata dall'enzima serin-acetil-transferasi (SAT), che catalizza il passaggio di un gruppo acetilico, proveniente dal acetil Co-A, all'amminoacido L-serina, per formare il composto o-acetil-L-serina (OAS). La reazione seguente è catalizzata

dall'enzima *O*-acetylserine(thiol)lyase (OASTL), e consiste nella sulfidrilazione della OAS in presenza di solfuro dando luogo a cisteina e acetato (Läuchi, 1993). Nella maggior parte degli stress biotici e abiotici, si ha un incremento della domanda di cisteina per la formazione di glutathione, composto chiave nella risposta agli stress e pertanto, un aumento dell'assorbimento e assimilazione del  $\text{SO}_4^{2-}$ .

I principali chelanti dei metalli pesanti conosciuti nelle piante e nei funghi sono le fitochelatine (PC), una famiglia composta da piccoli peptidi ricchi in Cys, e il glutathione costituito da solo 3 amminoacidi: acido glutammico (Glu), cisteina (Cys) e glicina (Gly); i residui di Glu e Cys sono legati attraverso un legame  $\gamma$ -carbammidico. Poiché la biosintesi delle PC è così strettamente dipendente dal GSH, è giusto presumere che esista una generale relazione tra l'assimilazione del solfato, la biosintesi di GSH e il meccanismo di detossificazione da metalli pesanti (Nocito et al. 2007).

## 1.8 Scopo della ricerca

Scopo di questo studio è valutare le risposte fisiologiche di una microalga verde, *Chlorella sorokiniana*, in seguito ad esposizione a due metalli pesanti: piombo e cadmio. Questo organismo, per la sua facilità di coltivazione in laboratorio, può essere considerato un buon organismo modello. È stata, inoltre, verificata l'eventuale correlazione tra stress da metalli pesanti e metabolismo dello zolfo.

## *Materiali e metodi*



## 2.1 Coltivazione delle alghe

L'alga verde unicellulare *Chlorella sorokiniana* (Shihira and Krauss, ceppo 211/8K), appartenente all'ordine delle *Chlorophyta* e alla famiglia delle *Chlorophyceae*, è stata fornita dalla collezione di alghe del Dipartimento di Biologia vegetale dell'Università di Napoli Federico II. *Chlorella* è un'alga mesofila che possiede un unico cloroplasto a forma di coppa, con o senza pirenoidi, un mitocondrio ed un piccolo nucleo. I pigmenti contenuti nei cloroplasti sono le clorofille *a* e *b*, gli  $\alpha$ - e  $\beta$ -caroteni e le xantofille. *Chlorella* si riproduce agamicamente; ciascuna cellula aploide, detta autospora, si divide due o tre volte tramite mitosi, producendo da quattro a otto cellule immobili che per rottura della parete cellulare, fuoriescono e danno vita ad un nuovo ciclo. *Chlorella sorokiniana* è cresciuta in laboratorio alla temperatura di 35°C, e in condizioni di luce continua mediante lampade fluorescenti (Philips TLD 30 W/55); le cellule sono inoltre, continuamente insufflate con aria arricchita del 5% di CO<sub>2</sub> (Di Martino Rigano et al., 2000). L'alga è coltivata in "batch" in condizioni di sufficienza di tutti i nutrienti. Il terreno base (pH 6.5), utilizzato in laboratorio per coltivare *C. sorokiniana*, ha la composizione riportata nella Tabella 1. L'azoto è fornito alla coltura sotto forma di nitrato di potassio (KNO<sub>3</sub>) alla concentrazione finale di 10 mM.

Il terreno base (pH 6.5) utilizzato per coltivare l'alga in batch aveva la seguente composizione: (Tab.1):

MATERIALE	QUANTITÀ NECESSARIA
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	13 mmol /L
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	4,3 mmol/L
NaCl	0,35 mmol/L
MgSO <sub>4</sub>	1,2 mmol/L
FeSO <sub>4</sub> /EDTA	$0,35 \times 10^{-3} / 4,5 \times 10^{-3}$
Oligoelementi <sup>1</sup>	0,5 ml/L
CaCl <sub>2</sub>	0,18 mmol/L

<sup>1</sup>La composizione degli oligoelementi era la seguente:

MnCl<sub>2</sub> 14 mM, H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> 46 mM, ZnSO<sub>4</sub> 0.77 mM, CuSO<sub>4</sub> 0.32 mM, (NH<sub>4</sub>)<sub>6</sub>Mo<sub>7</sub>O<sub>24</sub> 0.12 mM.

## 2.2 Metalli pesanti

Il cadmio utilizzato per stressare le cellule è cadmio cloruro ( $\text{CdCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ , Merk) e il piombo utilizzato è sotto forma di piombo acetato idrato  $\{\text{Pb}(\text{CH}_3\text{COO})_2$ , Carlo Erba}.

## 2.3 Determinazione del PCV

Il volume di impacchettato cellulare è determinato centrifugando a 4300 g per 10 minuti 10 ml di sospensione cellulare in tubi da ematocrito (10 ml) in centrifuga Sorvall.

## 2.4 Misure di fotosintesi e respirazione

Per le misure di fotosintesi e di respirazione sono utilizzate sospensioni cellulari di *C. sorokiniana* raccolte, tramite centrifugazione ( $4\,000\text{ g} \cdot 5$  minuti), durante la fase esponenziale di crescita e risospese in terreno nutritivo in bottiglie BOD (Biochemical Oxygen Demand). La velocità di fotosintesi viene misurata come evoluzione di ossigeno in cellule termostate ed opportunamente illuminate con una lampada ad incandescenza (Philips Comptalux 300W 13736 E/44), all'intensità luminosa di  $1000\text{ }\mu\text{mol di fotoni m}^{-2}\text{ s}^{-1}$ . Le variazioni di ossigeno sono misurate con elettrodo per Ossigeno (Orion 3 Star Thermo Scientific) connesso ad uno ionalizzatore. Per prevenire la limitazione di carbonio,

durante le misure sperimentali di fotosintesi, viene aggiunto  $\text{NaHCO}_3$  alla concentrazione finale di 10 mM. La velocità di respirazione viene misurata come consumo di ossigeno in bottiglia BOD termostata e oscurata con un foglio di alluminio.

La velocità di fotosintesi è ottenuta sottraendo ai valori misurati con l'ionizzatore il consumo respiratorio di ossigeno.

## 2.5 Misura della clorofilla totale e della clorofilla $\alpha$

Il contenuto di clorofilla totale nelle due alghe è determinato centrifugando a 4 000  $g$  \* 5 minuti un'aliquota di 5ml di sospensione algale e risospendendo il precipitato in *N-N*-dimetilformammide a 4 °C per 24 ore secondo il metodo di Inskeep e Bloom, 1985. Le letture di assorbenza sono effettuate a 664 nm e a 647 nm allo spettrofotometro (Thermo Biomate5) . Le formule adottate per tale determinazione sono le seguenti:

$$17,9 \cdot \text{Abs}_{647} + 8,08 \cdot \text{Abs}_{664} = \mu\text{g chl}_{\text{tot.}}$$

$$12,7 \cdot \text{Abs}_{664} - 2,79 \cdot \text{Abs}_{647} = \mu\text{g chl } \alpha$$

## **2.6 Determinazione delle proteine**

La concentrazione delle proteine (espressa come  $\text{mg ml}^{-1}$ ) negli estratti crudi è determinata seguendo il metodo descritto da Bradford (1976), utilizzando BSA (Albumina di siero bovina) come standard.

## **2.7 Preparazione dell'estratto crudo per l'OASTL**

Le alghe cresciute in differenti condizioni sono prelevate per la preparazione dell'estratto crudo. Aliquote di circa 300 ml di cellule sono centrifugate a 4300 g per 10 minuti; il pellet così ottenuto è risospeso in 10 ml di tampone d'estrazione avente la seguente composizione: tampone fosfato 50 mM (pH 7.5), ditioneitol (DTT) 100 mM, piridossal-5-fosfato (PALP) 10 mM. A ciò segue un passaggio nella pressa di FRENCH (Aminco, USA) a 16000 p.s.i. per lisare le cellule e una centrifugazione a 16000 g per 15 minuti a 4°C.

Il supernatante rappresenta l'estratto crudo che viene utilizzato per il saggio d'attività dell'enzima OASTL.

## 2.8 Determinazione dell'attività dell'OASTL

L'attività dell'OASTL viene misurata mediante determinazione colorimetrica della cisteina che si forma secondo la reazione:



La miscela di reazione contiene, in un volume finale di 0.9 ml:

100 mM di tampone Hepes/KOH (pH 7.2)

100 mM DTT

10 mM di *O*-acetilserina

5 mM di solfuro sodico

100 µl di estratto.

La reazione inizia aggiungendo la soluzione di disolfuro (NA<sub>2</sub>S 50 mM) e dopo aver incubato la miscela a 50°C per 10 minuti, la reazione viene arrestata aggiungendo 50 µl di acido tricloroacetico (TCA) al 20%. Segue centrifugazione in una centrifuga per eppendorf (Mini Spin plus) a 14000 rpm per 2 minuti.

A 600 µl della miscela di reazione, ottenuta dopo il saggio di attività, vengono aggiunti 100 µl di acido acetico e 200 µl di reattivo della ninidrina preparata immediatamente prima di usarlo (0.12 gr di ninidrina sciolti in 3 ml di acido acetico glaciale e in 2 ml di acido cloridrico al 37%). Si incuba la miscela per 10 minuti a 100°C, e dopo averla raffreddata in un bagno di acqua fredda si aggiungono 550 µl di etanolo per stabilizzare il complesso colorato formatosi. Viene, quindi, misurata l'assorbanza contro un bianco a 560 nm con uno spettrofotometro Thermo BioMate 5. Un'unità di attività corrisponde alla formazione di 1 µmole di *L*-cisteina prodotta al minuto in 1 ml di estratto.

## 2.9 Preparazione dell'estratto crudo per l'APX

Viene raccolto, tramite centrifugazione, 1L di coltura cellulare con un PCV di circa 2 µL/ml. Il pellet viene lavato 3 volte con tampone TAE e risospeso in 10 ml di tampone d'estrazione.

Il tampone TAE ha la seguente composizione:

Tris-acetato 50 mM pH 8

- EDTA 1mM pH 8

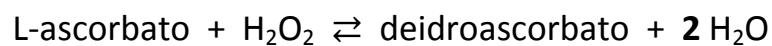
Il tampone d'estrazione è composto da:

- tampone TAE
- 330 mM sorbitolo
- 50  $\mu$ M ascorbato

Si procede con 2 passaggi nella pressa di French e si centrifuga in Sorvall a 4°C per 20 minuti. Il surnatante, conservato in ghiaccio, rappresenta l'estratto che contiene l'enzima.

## **2.10 Determinazione dell'attività dell'ascorbato perossidasi**

L'attività dell'enzima è valutata allo spettrofotometro alla lunghezza d'onda di 305 nm secondo la seguente reazione:



Essa è espressa come numero di moli di ascorbato ossidato nel tempo ( $\text{mol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1} \text{ prot.}$ ), usando un coefficiente d'estinzione pari a 0,18  $\text{mM cm}^{-1}$ .



Il mix contenuto nella cuvetta, con volume finale pari ad 1 ml, contiene:

- Tampone TAE pH 8
- 3 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>
- 2 mM ascorbato
- estratto

Essendo la reazione molto veloce, l'ascorbato che funge da donatore di elettroni, viene aggiunto poco prima di inserire le cuvette negli appositi alloggiamenti dello spettrofotometro programmato per effettuare le letture per 10 minuti.

Per il calcolo dell'attività enzimatica si procede attraverso due passaggi consecutivi. Il primo consiste nel calcolare l'attività enzimatica assoluta secondo la seguente formula:

$$AA = \Delta Abs_{305} \cdot Vol_{cuvetta} / Tempo \cdot \lambda \cdot Vol_{estratto} = \text{moli min}^{-1} \text{ litro}^{-1}_{estratto}$$

dove  $\lambda$  rappresenta il coefficiente d'estinzione molare (0,18 mM cm<sup>1</sup>);

per il calcolo dell'attività relativa, quella che a noi interessa, la formula è la seguente:

$$AR = AA / \text{mg proteine ml estratto}^{-1} = \text{mmol min}^{-1} \text{ mg proteine}^{-1}$$

## 2.11 Microscopia elettronica a trasmissione (TEM) convenzionale

La preparazione dei campioni per le osservazioni al microscopio elettronico a trasmissione (TEM) si articola nelle seguenti fasi successive: fissazione, disidratazione, inclusione in resina, ultramicrotomia e colorazione. Cellule di *Chlorella* non trattate e cellule esposte a 250  $\mu\text{M}$  di  $\text{Pb}^{2+}$  e  $\text{Cd}^{2+}$  per 24 ore, sono fissate in soluzione di gluteraldeide al 3% (Agar Scientific, U.K.) in tampone fosfato (0,065 M; pH 7,2-7,4) per 1,5 ore a temperatura ambiente. La disidratazione è eseguita con concentrazioni crescenti di alcol etilico (serie crescente degli alcoli) fino all'alcol etilico assoluto. I campioni, dopo passaggio per 20 minuti in ossido di propilene assoluto (Merk, Germany), vengono sottoposti ad inclusione tramite passaggi in soluzioni di ossido di propilene a concentrazioni crescenti di resina epossidica Spurr (Agar Scientific, U.K.) fino alla resina assoluta. Dopo polimerizzazione in stufa a 70°C per 24 ore, i blocchetti di resina contenenti i campioni sono sottoposti ad ultramicrotomia, ottenendo sezioni ultrasottili di 70-80 nm. Queste ultime, raccolte su retini di rame, sono colorate con soluzione di acetato di uranio e citrato di piombo. Le osservazioni ultrastrutturali sono eseguite al microscopio elettronico a trasmissione (TEM) FEI EM 208S, con una tensione di accelerazione di 80 KV.

## **2.12 Analisi statistica**

I valori mostrati sono la media di tre determinazioni  $\pm$  l'errore standard.

## *Risultati*

### 3.1 Effetti del cadmio sulla velocità di fotosintesi

Cellule di *Chlorella sorokiniana* cresciute in presenza di terreno sufficiente, sono sottoposte a trattamento con  $\text{CdCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$  alle concentrazioni di 50-100-250  $\mu\text{M}$  per 24h e confrontate con cellule non trattate. Le velocità di fotosintesi sono misurate dopo 2h e dopo 24h di esposizione. Le % della velocità di fotosintesi, sono mostrate nella Tabella 3.1, mentre i valori espressi come  $\text{mmol O}_2 \text{ prodotto ml}^{-1} \text{ PCV h}^{-1}$  sono mostrati nella Fig. 3.1. Per le misure vengono utilizzate cellule di *C. sorokiniana* coltivate a  $35^\circ\text{C}$  e raccolte durante la fase esponenziale di crescita. La velocità di fotosintesi di *C. sorokiniana* che nel controllo è pari a  $2,2 \pm 0,18 \text{ mmol O}_2 \text{ ml}^{-1} \text{ PCV h}^{-1}$  (100%), diminuisce all'aggiunta di concentrazioni crescenti di cadmio. Più precisamente è inibita del 36% dopo 2 ore di esposizione al cadmio  $50 \mu\text{M}$  e del 60% dopo 24 ore rispetto al controllo, passando rispettivamente da un valore di  $2,2 \pm 0,18 \text{ mmol O}_2 \text{ ml}^{-1} \text{ PCV h}^{-1}$  a  $1,4 \pm 0,09$  e  $0,9 \pm 0,05 \text{ mmol O}_2 \text{ ml}^{-1} \text{ PCV h}^{-1}$ . Con  $100 \mu\text{M}$  di  $\text{Cd}^{2+}$  la diminuzione è del 46% dopo 2 ore e dell'77% dopo 24 ore passando da  $2,2 \pm 0,18 \text{ mmol O}_2 \text{ ml}^{-1} \text{ PCV h}^{-1}$  a  $1,2 \pm 0,07$  e  $0,5 \pm 0,03 \text{ mmol O}_2 \text{ ml}^{-1} \text{ PCV h}^{-1}$  rispettivamente. Cellule di *Chlorella* esposte a  $250 \mu\text{M}$  mostrava una inibizione della fotosintesi del 78% dopo 2 ore di

esposizione e dell'86% dopo 24 ore di esposizione passando da  $2,2 \pm 0,18$  mmol O<sub>2</sub> ml<sup>-1</sup> PCV h<sup>-1</sup> del controllo a  $0,5 \pm 0,03$  mmol O<sub>2</sub> ml<sup>-1</sup> PCV h<sup>-1</sup> e  $0,3 \pm 0,02$  mmol O<sub>2</sub> ml<sup>-1</sup> PCV h<sup>-1</sup> rispettivamente (Fig.3.1).

**Tabella 3.1 Velocità di fotosintesi (%), in cellule di *Chlorella sorokiniana* esposte a 50-100 e 250 µM di cadmio**

Fotosintesi			
	50 µM Cd <sup>2+</sup>	100 µM Cd <sup>2+</sup>	250 µM Cd <sup>2+</sup>
controllo	100%	100%	100%
2 h	64%	54%	22%
24 h	40%	23%	14%

### 3.2 Effetti del cadmio sulla velocità di respirazione

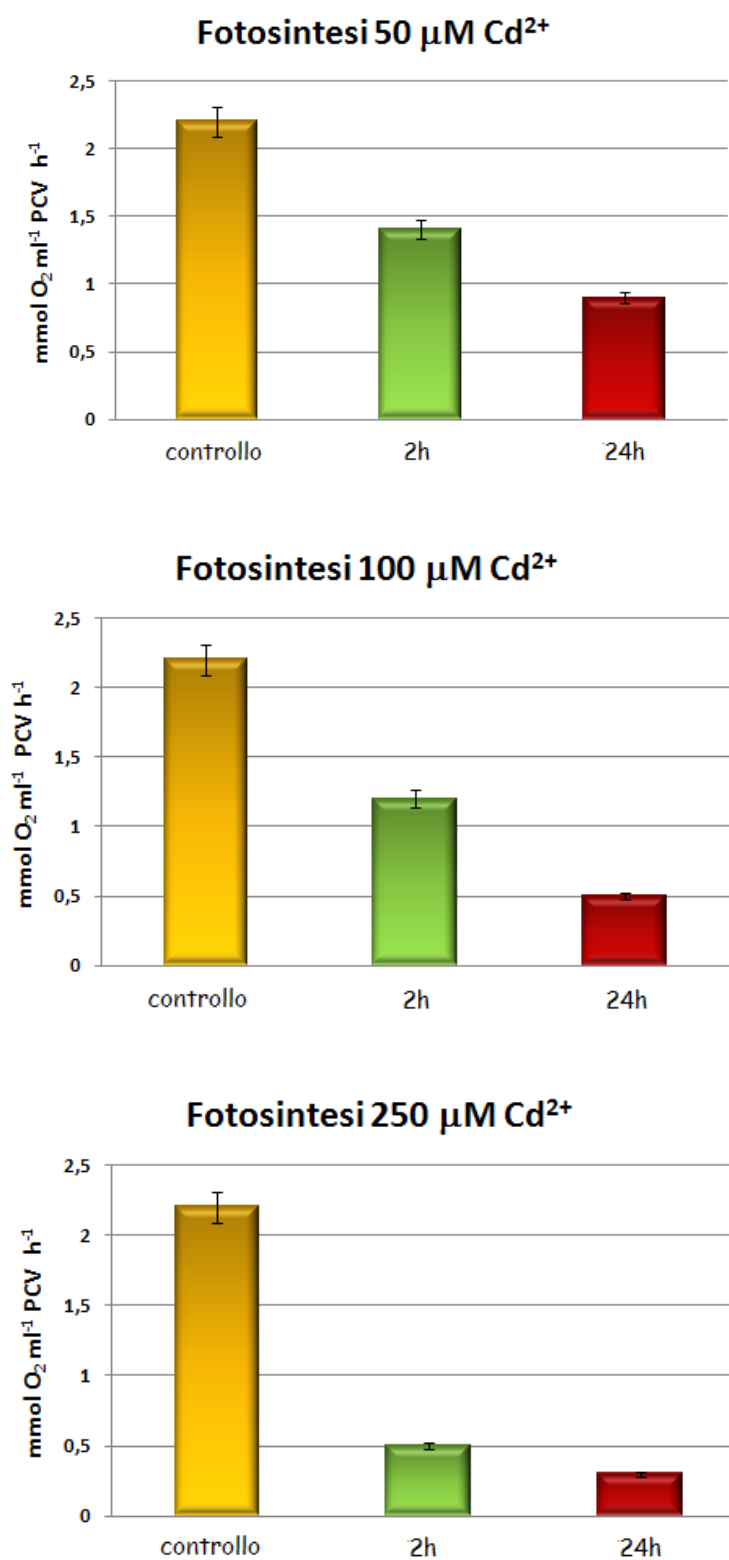
Nella Tabella 3.2, sono mostrate le % della velocità di respirazione di cellule di *C. sorokiniana*, esposte a differenti concentrazioni di cadmio 50-100 e 250 µM, rispetto a cellule cresciute in condizioni di sufficienza di tutti i nutrienti. I valori assoluti sono mostrati nella Fig. 3.2. Essi attestano

un incremento della velocità di respirazione del 29% dopo 2 ore di esposizione con un valore di  $0,7 \pm 0,04 \text{ mmol O}_2 \text{ ml}^{-1} \text{ PCV h}^{-1}$  rispetto al controllo, che mostra una velocità di respirazione pari a  $0,5 \pm 0,03 \text{ mmol O}_2 \text{ ml}^{-1} \text{ PCV h}^{-1}$  e del 55% dopo 24 ore con un valore pari a  $1,1 \pm 0,12 \text{ mmol O}_2 \text{ ml}^{-1} \text{ PCV h}^{-1}$ . Alla concentrazione di  $100 \mu\text{M}$  si ha un incremento del 55% dopo 2 ore di esposizione e del 64% dopo 24 ore di esposizione. La velocità di respirazione del controllo è di  $0,5 \pm 0,03 \text{ mmol O}_2 \text{ ml}^{-1} \text{ PCV h}^{-1}$  e dopo 2 ore e 24 ore è di  $1,1 \pm 0,13 \text{ mmol O}_2 \text{ ml}^{-1} \text{ PCV h}^{-1}$  e  $1,4 \pm 0,15 \text{ mmol O}_2 \text{ ml}^{-1} \text{ PCV h}^{-1}$  rispettivamente. Le variazioni di respirazione più significative si hanno durante l'esposizione delle cellule alla concentrazione di  $250 \mu\text{M}$ , per la quale è misurato un incremento della velocità di respirazione del 62% e del 72% rispetto al controllo, con valori pari a  $1,3 \pm 0,17$  e  $1,8 \pm 0,19 \text{ mmol O}_2 \text{ ml}^{-1} \text{ PCV h}^{-1}$  dopo 2 ore e dopo 24 ore, rispettivamente.

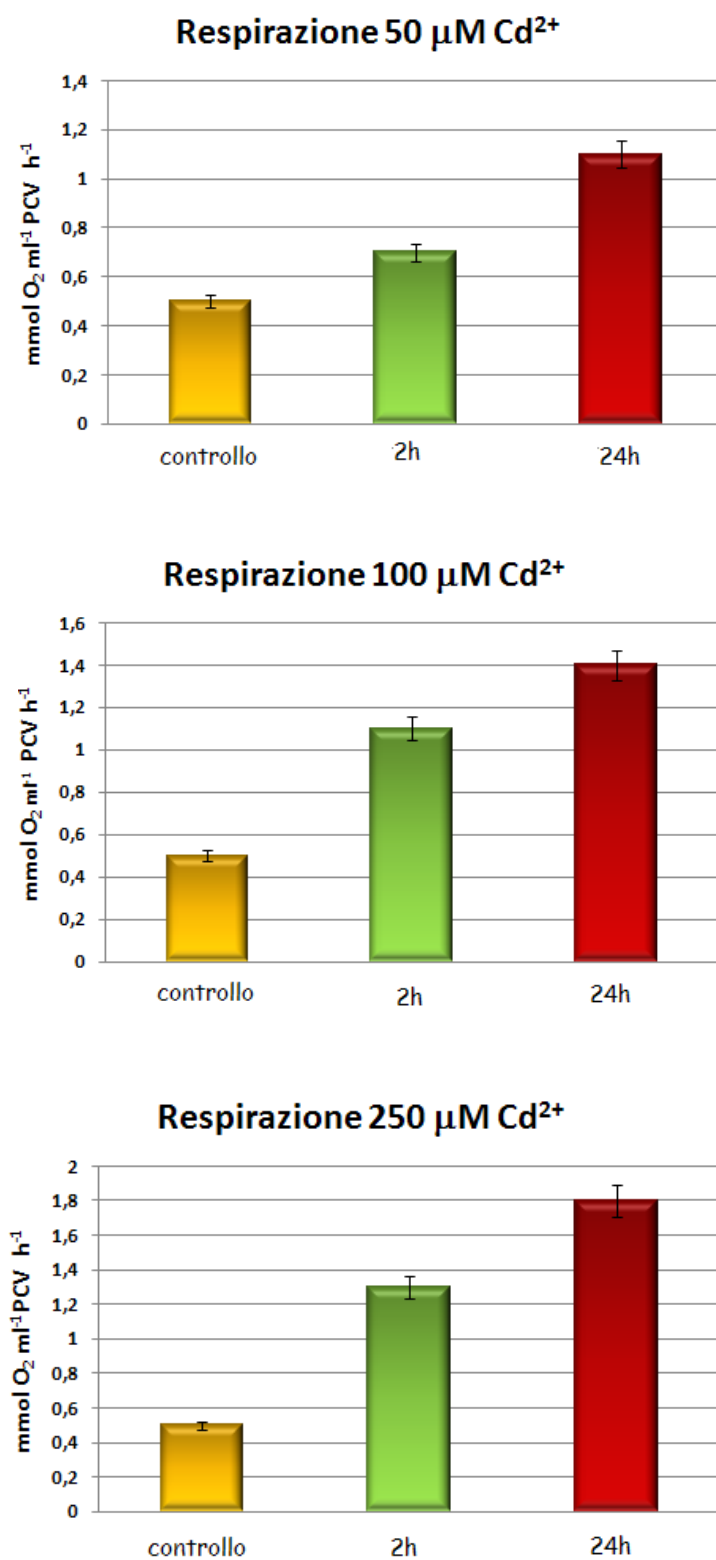
**Tabella 3.2 Velocità di respirazione (%) in cellule di *Chlorella sorokiniana* esposte a 50-100 e 250  $\mu\text{M}$  di cadmio.**

Respirazione			
	50 $\mu\text{M}$ $\text{Cd}^{2+}$	100 $\mu\text{M}$ $\text{Cd}^{2+}$	250 $\mu\text{M}$ $\text{Cd}^{2+}$
Controllo	100%	100%	100%
2 h	129%	155%	162%
24 h	155%	164%	172%





**Figura 3.1** Velocità di fotosintesi in cellule di *Chlorella sorokiniana* esposte a 50-100-250  $\mu\text{M}$  di  $\text{Cd}^{2+}$



**Fig. 3.2** Velocità di respirazione in cellule di *Chlorella sorokiniana* esposte a 50-100-250  $\mu\text{M}$  di cadmio

### 3.3 Effetti del piombo sulla velocità di fotosintesi

Utilizzando la stessa procedura degli esperimenti precedenti, sospensioni cellulari di *Chlorella sorokiniana* sono esposte a  $\text{Pb}(\text{CH}_3\text{COO})_2$  alle concentrazioni di 50-100-250  $\mu\text{M}$ . La velocità di fotosintesi di *C. sorokiniana* che nel controllo è pari a  $2,2 \pm 0,19 \text{ mmol O}_2 \text{ ml}^{-1} \text{ PCV h}^{-1}$  (100%) subisce una inibizione all'aggiunta di piombo alle diverse concentrazioni. Come riportato nella Tabella 3.3, la fotosintesi, è inibita del 28% e del 64% dopo 2 ore e 24 ore di esposizione a piombo 50  $\mu\text{M}$ , mostrando una velocità di  $1,6 \pm 0,17$  e  $0,8 \pm 0,06 \text{ mmol O}_2 \text{ ml}^{-1} \text{ PCV h}^{-1}$  rispettivamente (Fig. 3.3). Alla concentrazione di 100  $\mu\text{M}$  si ha una riduzione del 33% dopo 2 ore e del 69% dopo 24 ore passando da  $2,2 \pm 0,19 \text{ mmol O}_2 \text{ ml}^{-1} \text{ PCV h}^{-1}$  del controllo a  $1,5 \pm 0,7$  e  $0,7 \pm 0,04 \text{ mmol O}_2 \text{ ml}^{-1} \text{ PCV h}^{-1}$  rispettivamente. Infine, anche nel caso del piombo, si evidenzia la maggiore inibizione della velocità di fotosintesi alla concentrazione di 250  $\mu\text{M}$ . Infatti si ha una inibizione del 42% dopo 2 ore di esposizione e dell'78% dopo 24 ore passando da  $2,2 \pm 0,19 \text{ mmol O}_2 \text{ ml}^{-1} \text{ PCV h}^{-1}$  del controllo a  $1,3 \pm 0,6$  e  $0,5 \pm 0,03 \text{ mmol O}_2 \text{ ml}^{-1} \text{ PCV h}^{-1}$  dopo 2 ore e dopo 24 ore di esposizione rispettivamente (Fig. 3.3)

**Tabella 3.3 Velocità di fotosintesi (%) in cellule di *Chlorella sorokiniana* esposte a 50-100 e 250  $\mu\text{M}$  di piombo.**

Fotosintesi			
	50 $\mu\text{M}$ $\text{Pb}^{2+}$	100 $\mu\text{M}$ $\text{Pb}^{2+}$	250 $\mu\text{M}$ $\text{Pb}^{2+}$
controllo	100%	100%	100%
2 h	72%	67%	58%
24 h	36%	31%	22%

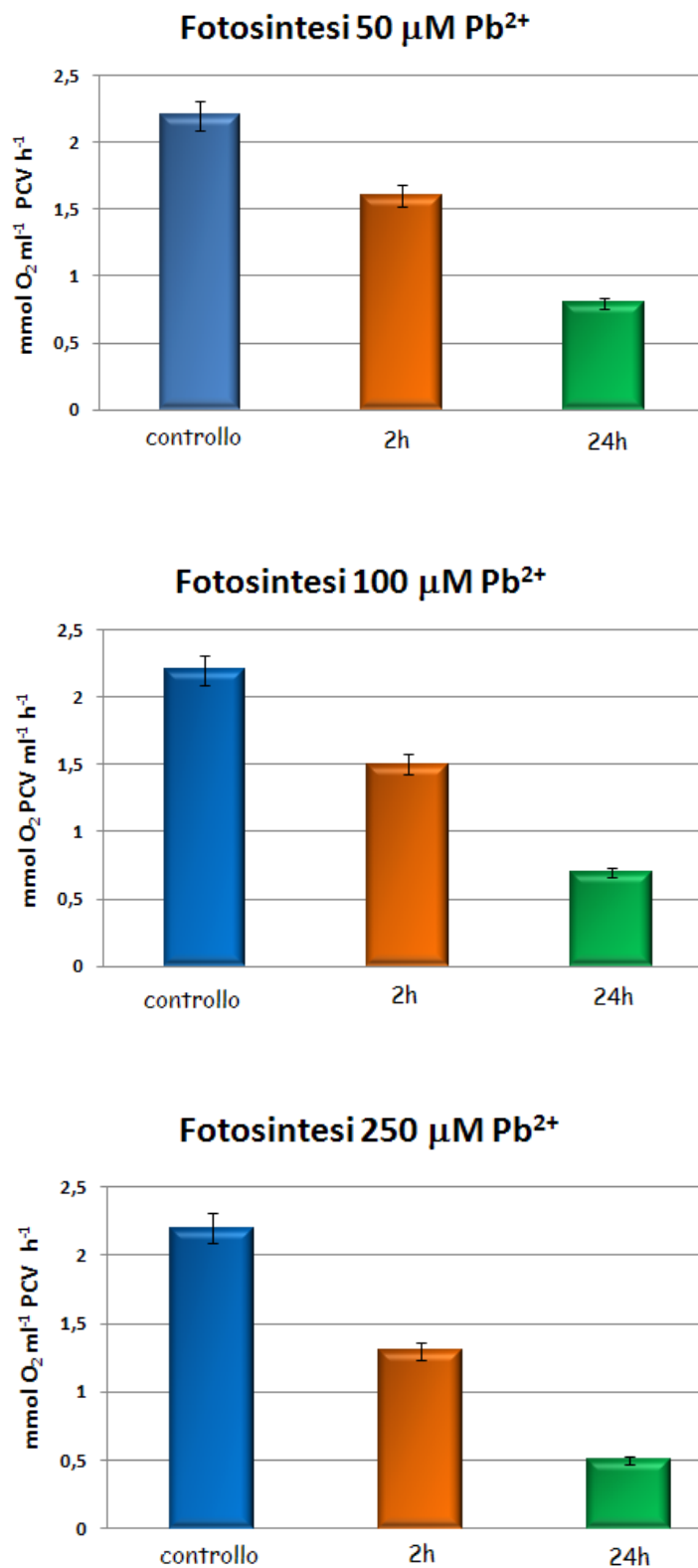
### 3.4 Effetti del piombo sulla velocità di respirazione

Analogamente a quanto si è osservato in colture cellulari di *Chlorella sorokiniana* esposte al cadmio, anche in cellule esposte al piombo si constata un incremento della velocità di respirazione in seguito ad esposizione a questo metallo pesante. Infatti, come è mostrato nella Tabella 3.4 alla concentrazione di 50  $\mu\text{M}$ , dopo 2 ore e 24 ore, si ha un aumento del 29% e del 45% rispettivamente, passando da  $0,50 \pm 0,04$   $\text{mmol O}_2 \text{ ml}^{-1} \text{ PCV h}^{-1}$  del controllo a  $0,7 \pm 0,06$  e  $0,9 \pm 0,07$   $\text{mmol O}_2 \text{ ml}^{-1} \text{ PCV h}^{-1}$ . Simile andamento si ha durante esposizione a 100  $\mu\text{M}$ . L'incremento della velocità di respirazione è del 45% dopo 2 ore e del 55% dopo 24 ore. Le maggiori variazioni si hanno durante esposizione alla

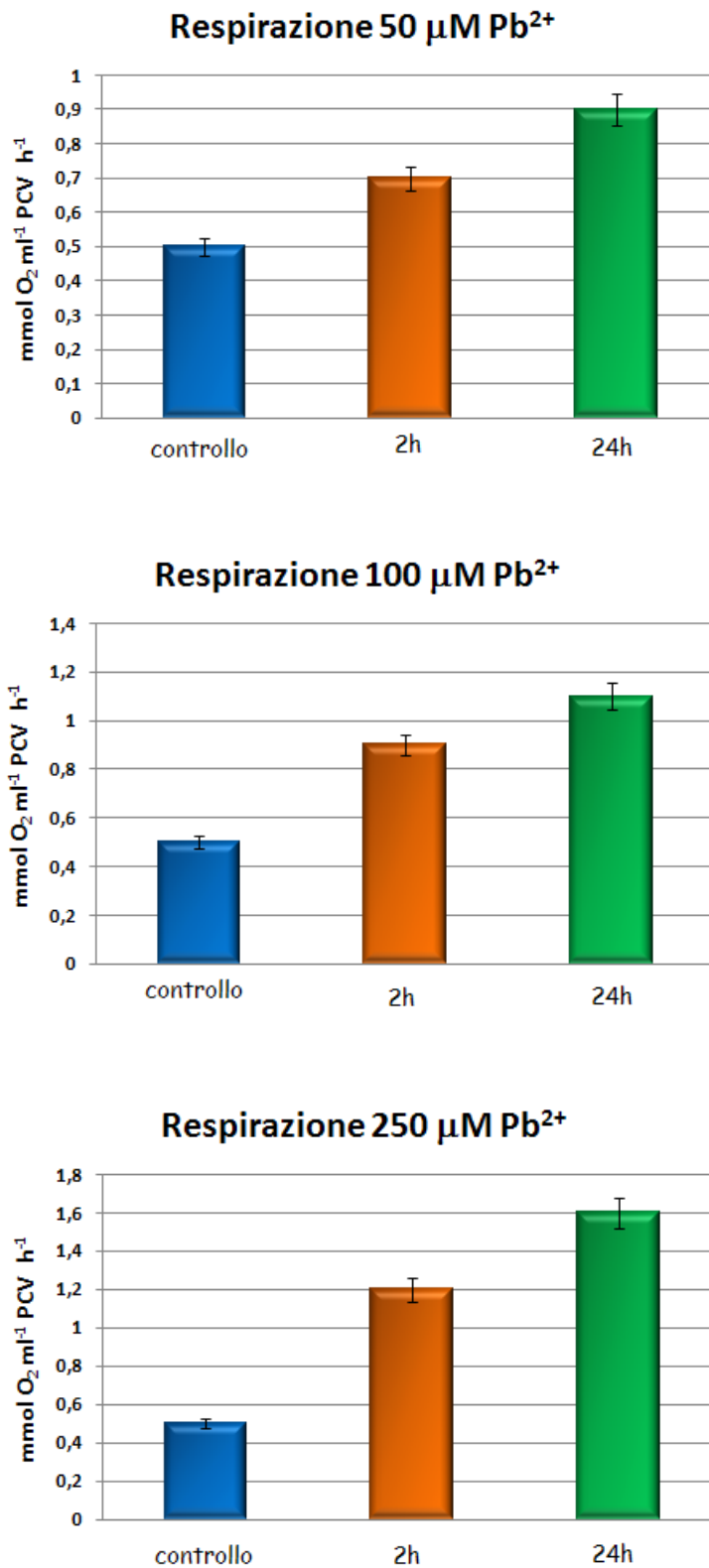
concentrazione di 250  $\mu\text{M}$ . In questo caso l'incremento della velocità di respirazione è del 58% e del 69% dopo 2 e 24 ore di esposizione passando da un valore di  $0,5 \pm 0,04 \text{ mmol O}_2 \text{ ml}^{-1} \text{ PCV h}^{-1}$  del controllo a  $1,2 \pm 0,7$  e  $1,6 \pm 0,9 \text{ mmol O}_2 \text{ ml}^{-1} \text{ PCV h}^{-1}$  rispettivamente (Fig. 3.4).

**Tabella 3.4** Variazione della velocità di respirazione (%) in cellule di *Chlorella sorokiniana* esposte a 50-100 e 250  $\mu\text{M}$  di piombo.

Respirazione			
	50 $\mu\text{M Pb}^{2+}$	100 $\mu\text{M Pb}^{2+}$	250 $\mu\text{M Pb}^{2+}$
controllo	100%	100%	100%
2 h	129%	145%	158%
24 h	145%	155%	169%



**Fig. 3.3** Velocità di fotosintesi in cellule di *Chlorella sorokiniana* esposte 50-100-250  $\mu\text{M}$  di piombo

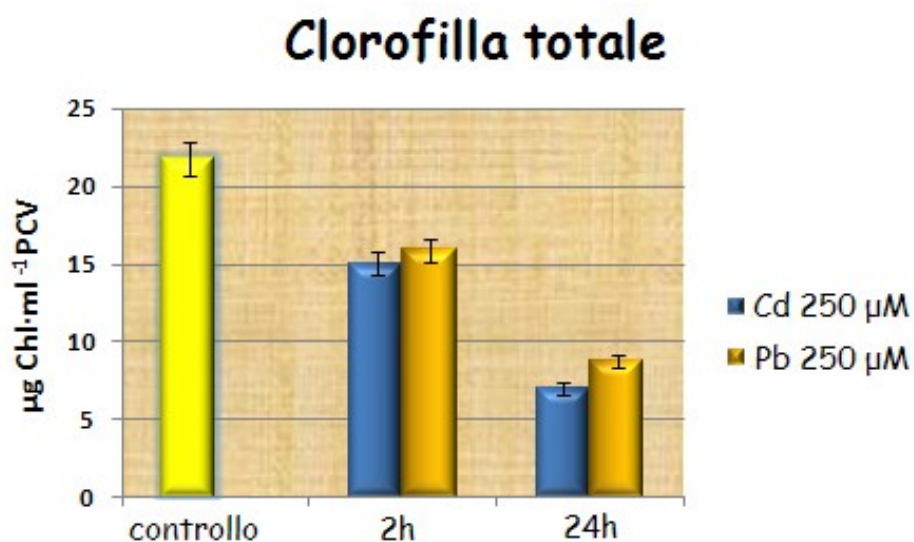


**Figura 3.4** Velocità di respirazione in cellule di *Chlorella sorokiniana* esposte a 50-100-250  $\mu\text{M}$  di piombo

### 3.5 Effetti del piombo e cadmio sulla concentrazione dei pigmenti

#### fotosintetici

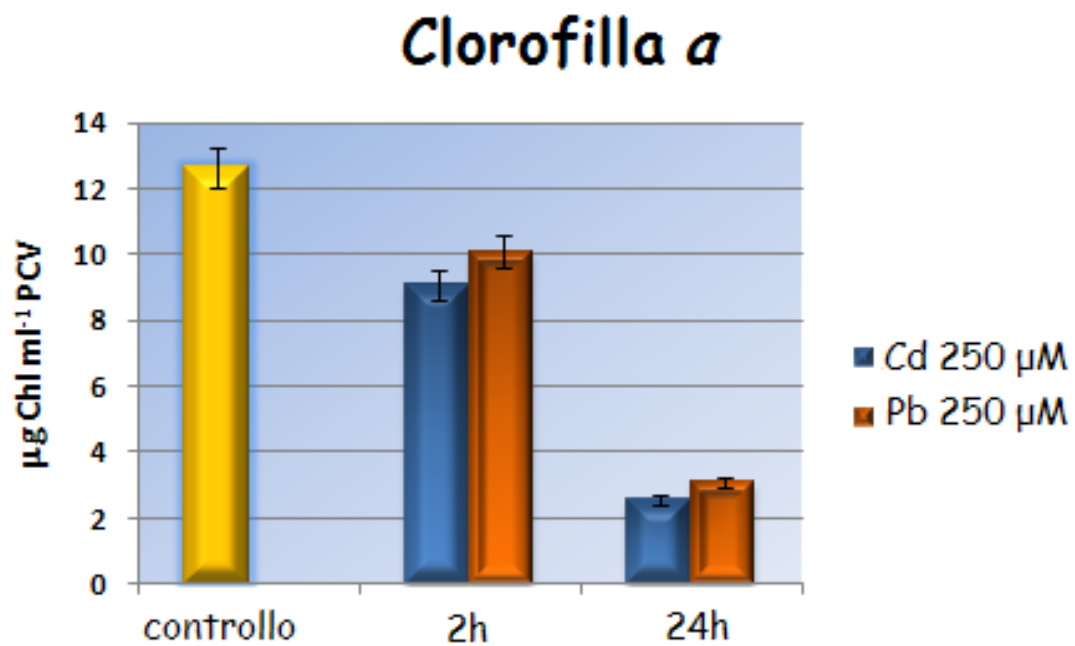
Le variazioni di concentrazione di clorofilla totale e di clorofilla *a* è misurata in cellule controllo di *C. sorokiniana* e in cellule esposte a cadmio e piombo 250  $\mu\text{M}$  per 2 ore e per 24 ore. Come è mostrato nelle Fig. 3.5 e 3,6 si ha una diminuzione della loro concentrazione dopo esposizione ai due metalli pesanti. In particolare dopo 2 ore di esposizione la diminuzione del contenuto di clorofilla totale è di circa il 30% per tutti e due i metalli e dopo 24 ore la sua concentrazione si riduce del 60% rispetto al controllo (Fig. 3.5).



**Figura 3.5** Variazione della concentrazione della clorofilla totale in cellule di *Chlorella sorokiniana* in presenza di  $\text{Pb}^{2+}$  e  $\text{Cd}^{2+}$  250  $\mu\text{M}$



Anche per la clorofilla *a* si ha una diminuzione in seguito ad esposizione ad entrambi i metalli. Infatti dopo 2 ore la sua concentrazione si è ridotta di circa il 20% rispetto al controllo e dopo 24 ore la diminuzione arriva a circa l'80%. (Fig. 3.6).



**Figura 3.6** Variazione della concentrazione della clorofilla *a* in cellule di *Chlorella sorokiniana* esposte a piombo e cadmio 250 µM

### 3.6 Crescita cellulare

La crescita cellulare della microalga verde *Chlorella sorokiniana* è misurata esprimendola come aumento di volume di impacchettato cellulare (PCV) i cui valori sono presentati nella figura 3.7. È stato osservato che in cellule controllo, il PCV incrementa in modo costante passando da un valore di  $0,5 \pm 0,03 \mu\text{L} \cdot \text{ml}^{-1}$  misurato al tempo zero, ad un valore , dopo 24 ore, di circa  $3 \pm 0,12 \mu\text{L} \cdot \text{ml}^{-1}$ . Cellule esposte a cadmio, dopo 24 ore il PCV mostrano un valore di  $1,2 \pm 0,5 \mu\text{L} \cdot \text{ml}^{-1}$ , mentre in seguito ad esposizione a 250  $\mu\text{M}$  di piombo esso raggiunge il valore di  $2,2 \pm 0,9 \mu\text{L} \cdot \text{ml}^{-1}$  a 24h.

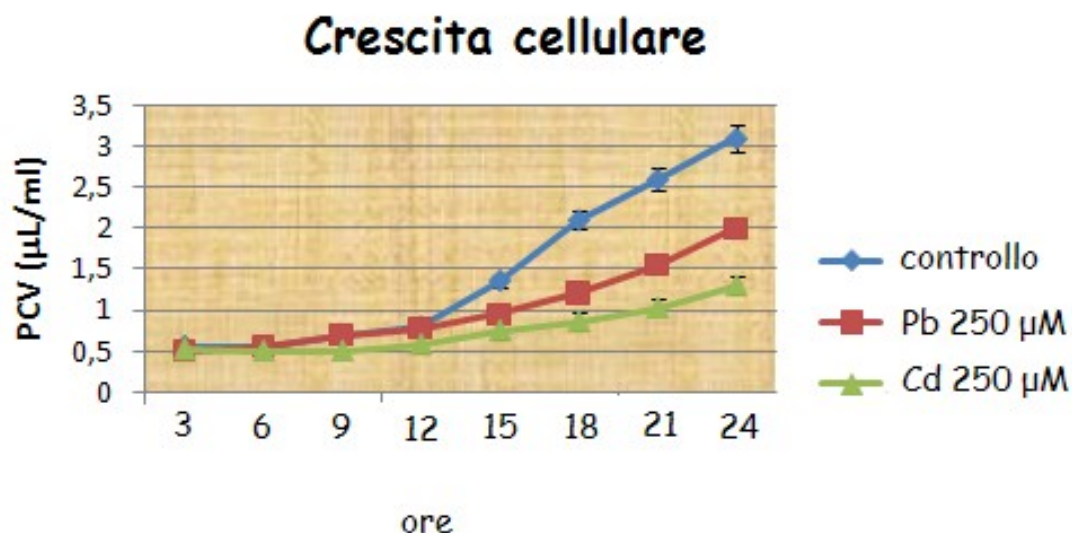


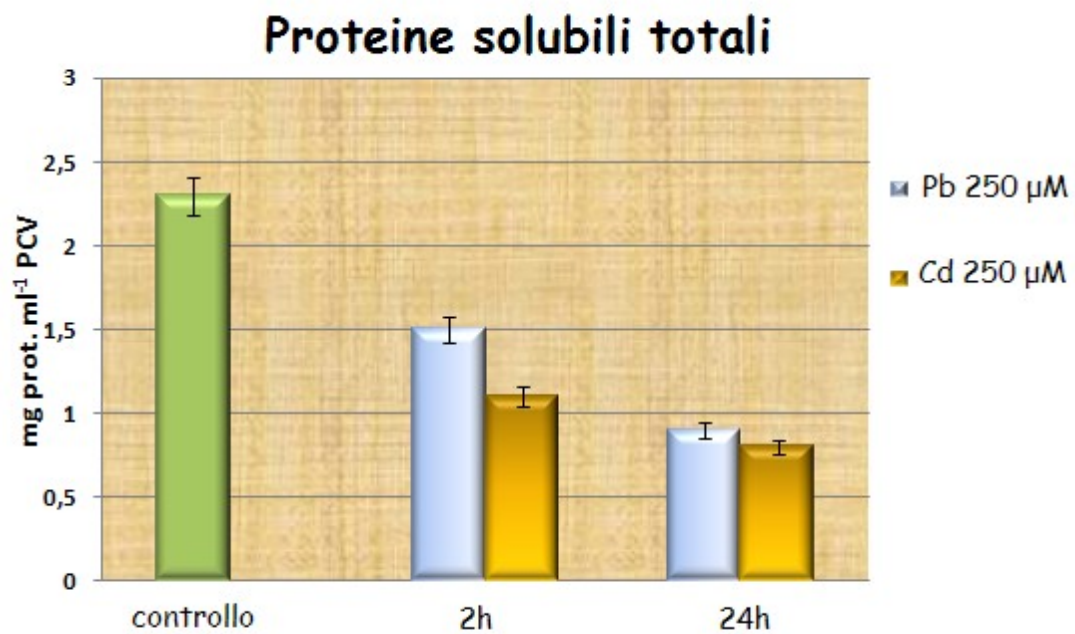
Figura 3.7 Crescita cellulare di *Chlorella sorokiniana* esposta a

piombo.e cadmio 250  $\mu\text{M}$

### 3.7 Effetti del piombo e del cadmio sulla concentrazione delle proteine solubili

La concentrazione delle proteine solubili è misurata allo spettrofotometro alla lunghezza d'onda di 595 nm in estratti crudi, preparati da cellule controllo e cellule trattate di *C. sorokiniana*, come descritto nel capitolo dei Materiali e metodi. Sospensioni cellulari di *C. sorokiniana*, risospese in terreno di coltura sufficiente (cellule controllo) e in terreno contenente  $\text{Cd}^{2+}$  e  $\text{Pb}^{2+}$  250  $\mu\text{M}$  (cellule trattate ) sono prelevate dopo 2 ore e dopo 24 ore, dall'aggiunta del metallo pesante per la preparazione degli estratti. Dopo aver preparato l'estratto con il tampone d'estrazione, passaggio alla pressa di French e successiva centrifugazione, si aggiungono 10  $\mu\text{L}$  di surnatante per ogni cuvetta contenente la soluzione di Biorad; segue la lettura allo spettrofotometro alla lunghezza d'onda di 595 nm. In cellule di *Chlorella sorokiniana* cresciute in presenza di tutti i nutrienti il contenuto di proteine solubili è di  $2,3 \pm 0,14 \text{ mg ml}^{-1}$  PCV (Fig. 3.8). Risulta essere di  $1,5 \pm 0,08 \text{ mg ml}^{-1}$  PCV dopo 2 ore di esposizione a piombo 250  $\mu\text{M}$  e  $0,9 \pm 0,03 \text{ mg ml}^{-1}$  PCV dopo 24 ore di esposizione, con una diminuzione del 35% e del 61% dopo 2 ore e 24 ore rispettivamente. Invece in seguito a esposizione a cadmio 250  $\mu\text{M}$  il contenuto di proteine

solubili diminuiscono a  $1,1 \pm 0,13 \text{ mg ml}^{-1} \text{ PCV}$  dopo 2 ore ed a  $0,8 \pm 0,10 \text{ mg ml}^{-1} \text{ PCV}$  dopo 24 ore di esposizione. La diminuzione è del 52% dopo 2 ore e del 66% dopo 24 ore.



**Figura 3.8** Variazione della concentrazione delle proteine solubili in cellule di *Chlorella sorokiniana* in presenza di piombo e cadmio 250  $\mu\text{M}$

### 3.8 Effetti del piombo e del cadmio sull'attività dell'ascorbato perossidasi

Cellule controllo di *C. sorokiniana* e cellule trattate con  $\text{Cd}^{2+}$  e  $\text{Pb}^{2+}$  alla concentrazione di 250  $\mu\text{M}$  sono raccolte dopo 2 ore e 24 ore tramite centrifugazione. Il pellet è risospeso in 10 ml di tampone d'estrazione preparato secondo il protocollo descritto nei materiali e metodi. L'attività dell'enzima ascorbato perossidasi (APX) è saggiata allo spettrofotometro alla lunghezza d'onda di 305 nm. La Fig. 3.9 mostra che in cellule controllo l'attività dell'APX è pari a  $0,15 \pm 0,003 \text{ mmol min}^{-1} \text{ mg}^{-1} \text{ prot.}$  Dopo due ore dall'aggiunta di cadmio 250  $\mu\text{M}$  essa mostrava un valore di  $0,75 \pm 0,005 \text{ mmol min}^{-1} \text{ mg}^{-1} \text{ prot.}$  fino a raggiungere il valore di  $1,1 \pm 0,07 \text{ mmol min}^{-1} \text{ mg}^{-1} \text{ prot.}$  dopo 24 ore di esposizione. In seguito ad esposizione a piombo 250  $\mu\text{M}$  l'attività dell'ascorbato perossidasi mostra un valore di  $0,18 \pm 0,003 \text{ mmol min}^{-1} \text{ mg}^{-1} \text{ prot.}$  dopo 2 ore, raggiungendo un valore di  $1,2 \pm 0,08 \text{ mmol min}^{-1} \text{ mg}^{-1} \text{ prot.}$  dopo 24 ore di stress da metallo.

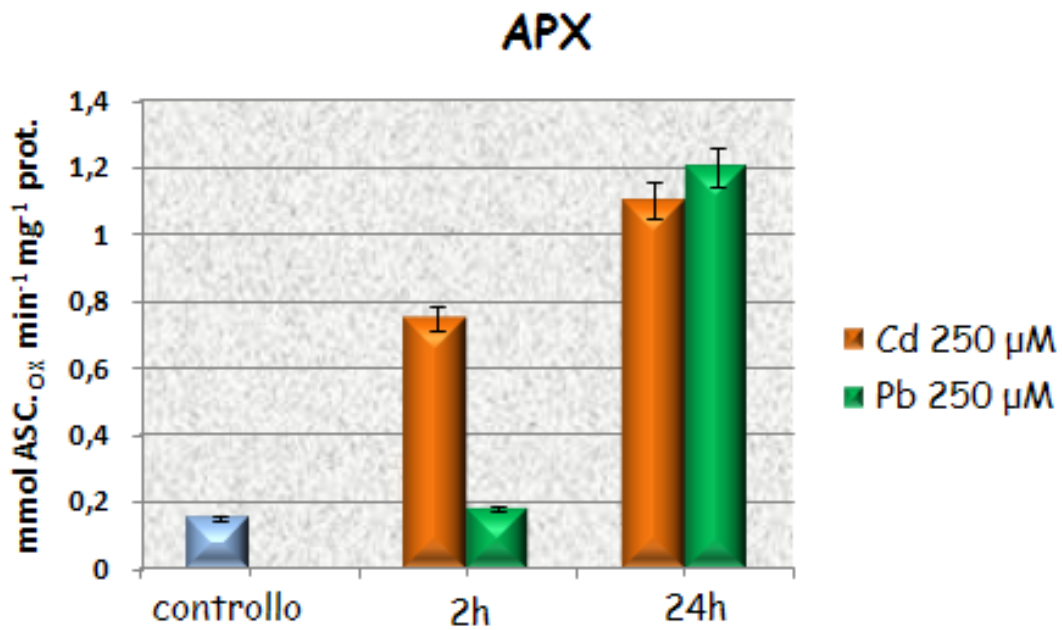
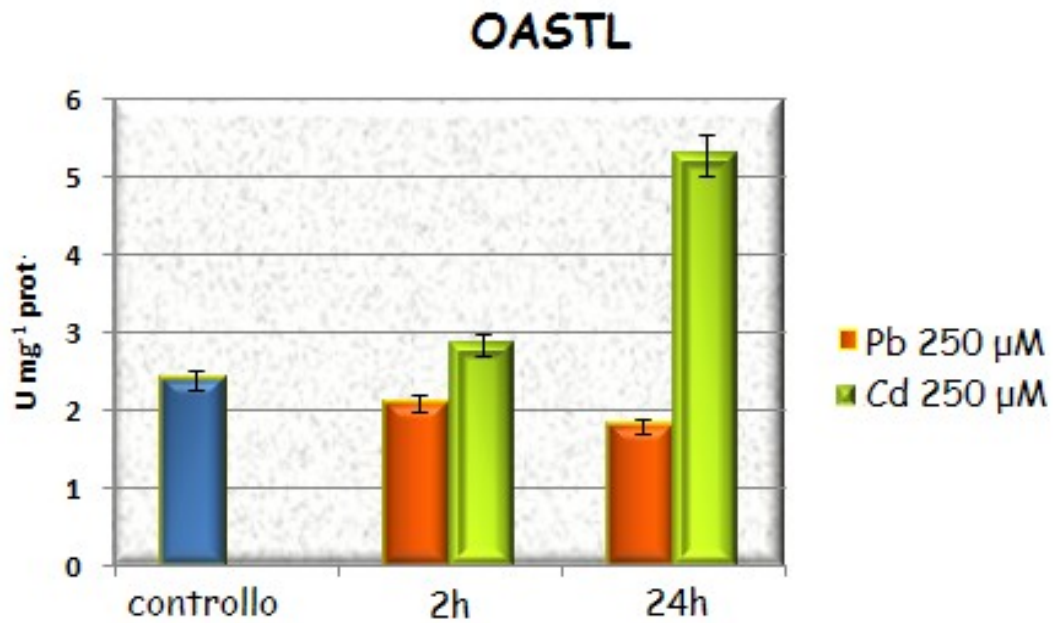


Figura 3.9 Attività dell'ascorbato perossidasi in cellule di *Chlorella sorokiniana* in presenza di piombo e cadmio 250  $\mu\text{M}$ .

### 3.9 Attività dell'O-acetil-serina(tio)liasi

Nella Fig. 3.10 è mostrato l'andamento dell'attività enzimatica dell'OASTL. Sono state utilizzate cellule di *C. sorokiniana* controllo e cellule esposte a cadmio e piombo (250  $\mu\text{M}$ ) per 2 ore e 24 ore. Cellule controllo presentano un'attività dell'enzima OASTL pari a  $2,4 \pm 0,17 \text{ U mg}^{-1} \text{ prot.}$  e in seguito ad esposizione a piombo 250  $\mu\text{M}$  non si osserva una variazione significativa, infatti dopo 2 ore e dopo 24 ore i valori d'attività dell'OASTL erano pari a  $2,1 \pm 0,15$  e  $1,8 \pm 0,11 \text{ U mg}^{-1} \text{ prot.}$  rispettivamente. Un

considerevole incremento si osserva solo dopo 24 ore di esposizione a cadmio 250  $\mu\text{M}$ , con un valore pari a  $5,3 \pm 0,2$  U  $\text{mg}^{-1}$  prot.

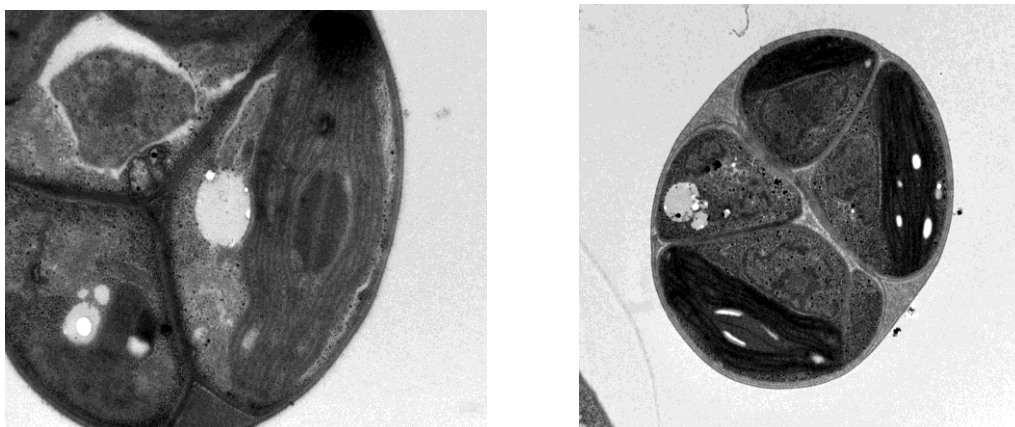


**Figura 3.10** Attività dell'O-acetil-serina(tio)liasi in cellule di *Chlorella sorokiniana* in presenza di piombo e cadmio 250  $\mu\text{M}$ .

### 3.10 Variazioni ultrastrutturali osservate al TEM

Cellule di *Chlorella sorokiniana* controllo e trattate, sono state osservate al microscopio elettronico a trasmissione (TEM) per verificare gli eventuali danni o cambiamenti ultrastrutturali in seguito ad esposizione a questi due metalli.

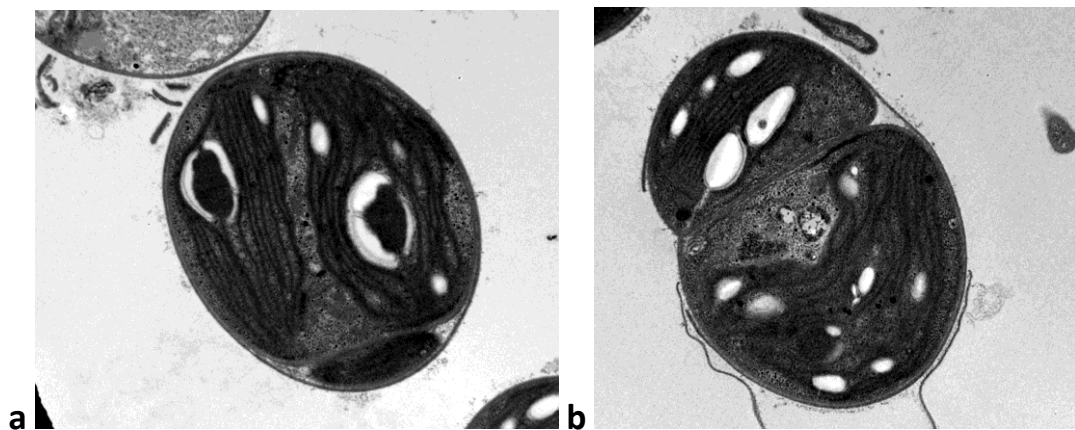
Le cellule sono state esposte a tutte e due i metalli per 24h alla concentrazione di 250  $\mu$ M. Nelle cellule controllo (Fig. 3.11 a-b), si osserva la presenza di un unico cloroplasto a coppa che occupa gran parte del citoplasma con membrane tilacoidali di tipo *granali*, un pirenoide a cui sono addossati modesti depositi di amido. Sono visibili piccoli vacuoletti sparsi nel citoplasma.



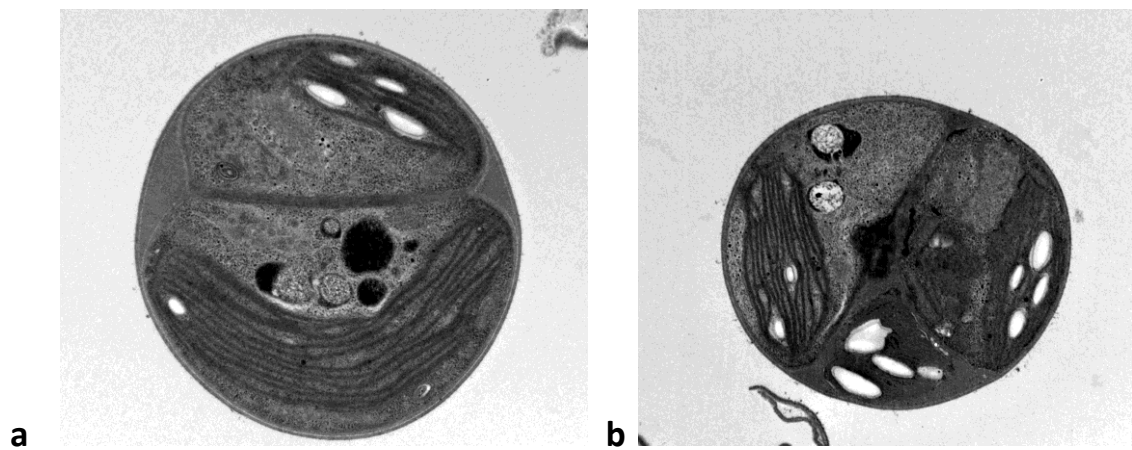
**Figura 3.11** Immagini al microscopio elettronico a trasmissione (TEM) di cellule controllo di *Chlorella sorokiniana*.



In cellule di *Chlorella* esposte per 24h a cadmio (Fig. 3.12 a-b) e a piombo (Fig. 3.13 a-b), alla concentrazione di 250 $\mu$ M per entrambi, sono evidenti variazioni strutturali a carico del sistema lamellare che appare ricco di tilacoidi di tipo *agranali*, rispetto al controllo dove sono soprattutto di tipo *granali*. I depositi di amido a ridosso del pirenoide sono diventati più consistenti ed i vacuoli risultano essere più grandi e densi agli elettroni, rafforzando l'ipotesi di un loro ruolo nel sequestro dei metalli pesanti.



**Figura 3.12** Immagini al microscopio elettronico a trasmissione (TEM) di cellule di *Chlorella sorokiniana* esposte a 250  $\mu$ M di  $\text{Cd}^{2+}$ ; (b) cellula in divisione.



**Figura 3.13** Immagini di cellule di *Chlorella sorokiniana* al microscopio elettronico a trasmissione (TEM) esposte a 250  $\mu\text{M}$  di  $\text{Pb}^{2+}$ ; (a) cellula in divisione.

## *Discussione*

I metalli pesanti piombo e cadmio sono stati analizzati per i loro effetti sul metabolismo di una microalga mesofila, *Chlorella sorokiniana*. In particolare lo studio ha riguardato gli effetti provocati da tali metalli pesanti sulla capacità fotosintetica, la velocità di respirazione e la velocità di crescita. Sono state anche valutate le variazioni dei livelli di attività di due enzimi, ascorbato perossidasi (APX), un enzima chiave del meccanismo di detossificazione dalle specie reattive dell'ossigeno (ROS), e O-acetil-serina(tio)lasi (OASTL), un enzima fondamentale del metabolismo dello zolfo, nonché le variazioni dei livelli del contenuto di pigmenti fotosintetici (clorofilla *a* e clorofille totali) e di proteine solubili totali.

I risultati ottenuti, hanno mostrato che gli effetti tossici del piombo e del cadmio in *Chlorella sorokiniana*, hanno un andamento dose e tempo dipendente, confermando i risultati ottenuti da Skowron'ski (1991), con un'altra microalga verde *Trebouxia sp.* (Harding e Whitton, 1977; Vymazal, 1986). Entrambi i metalli pesanti, alla concentrazione di 250  $\mu\text{M}$ , provocano un'inibizione della velocità di fotosintesi, che raggiunge il 78% e 86% (Tabelle 3.1 e 3.3) dopo 24 ore di esposizione a piombo e cadmio rispettivamente. L'effetto inibitorio dei due metalli sulla fotosintesi è stato confermato anche dalle osservazioni al TEM. Infatti, in cellule

trattate, si è osservata una diversa morfologia del sistema lamellare che passa da un'organizzazione caratterizzata soprattutto da membrane tilacoidali di tipo *granali*, visibili nelle cellule controllo (Fig. 3.11), a un'organizzazione con membrane tilacoidali di tipo *agranali* nelle cellule esposte (Fig. 3.12 e 3.13).

A conferma di questi risultati ci sono anche i dati delle misure di concentrazione dei pigmenti fotosintetici (Fig. 3.5 e 3.6). In *Chlorella sorokiniana*, dopo 2 ore di esposizione a piombo e cadmio, si osserva una diminuzione della clorofilla totale del 30% rispetto al controllo, che arriva al 60% dopo 24 ore (Fig. 3.5). Allo stesso modo, la clorofilla *a* diminuisce del 20% e dell'80% dopo 2 e 24 ore di esposizione rispettivamente (Fig. 3.6). La diminuzione delle concentrazioni di Chl *a* e Chl totale, giustifica ulteriormente la ridotta capacità fotosintetica di *Chlorella sorokiniana* in condizioni di stress da metalli pesanti. Anche in altri organismi, come in *Lemna minor* o nella microalga verde *Chlamydomonas reinhardtii* (Zhang et al., 2001; Lobban e Harrison, 1994) è stato osservato che la perdita dell'attività fotosintetica, in condizioni di stress, è incrementata da una degradazione quasi totale dell'enzima Rubisco e della clorofilla.

Il cadmio e il piombo, influenzano anche la respirazione la cui velocità è stimolata, contrariamente a quanto accade per la velocità di fotosintesi. Si osserva, infatti, un forte incremento della velocità di respirazione, che raggiunge il 69% e 72% dopo 24 ore di esposizione a piombo e cadmio 250  $\mu$ M rispettivamente (Tabelle 3.2 e 3.4). Questo notevole incremento della respirazione si può spiegare come una strategia che *Chlorella sorokiniana* adotta, in presenza di inibizione della fotosintesi, per sopperire alla deplezione energetica. Produce, quindi, con la fosforilazione ossidativa, l'energia necessaria per sostenere la sua crescita cellulare che, durante l'esposizione ai metalli pesanti, rallenta senza, tuttavia, inibirsi del tutto (Fig. 3.7). Infatti, in cellule trattate, si è osservato un'inibizione della crescita rispetto al controllo del 36% e del 58% in presenza di piombo e cadmio (250  $\mu$ M), rispettivamente, come avviene anche in *Laminaria* (Markman, 2000) e in *Scenedesmus subcapitatus* (Knauer et al., 1996). Dal profilo proteico di cellule trattate di *Chlorella sorokiniana* si osserva anche una diminuzione dei livelli di proteine totali solubili (Fig. 3.8), che presentano un valore minimo dopo 24 ore. Evidentemente *Chlorella* attinge al pool proteico interno, come sorgente di azoto e zolfo, per mantenere la crescita cellulare, e probabilmente utilizza anche le proteine del cloroplasto. Infatti, già nel

1998 Esquivel et al. hanno attribuito all'enzima Rubisco un possibile ruolo di proteina di riserva in condizioni di stress.

In cellule di *C. reinhardtii* esposte a cadmio, Zhang et al., 2001 hanno osservato un aumento del contenuto di amido intracellulare, oltre alla diminuzione della concentrazione delle proteine. L'osservazione al TEM ha evidenziato che anche in cellule trattate di *Chlorella sorokiniana*, aumentano i depositi di amido a ridosso del pirenoide all'interno del cloroplasto, (Fig. 3.12 e 3.13), così come sono evidenti grandi vacuoli densi agli elettroni, rafforzando l'ipotesi di un loro ruolo nel sequestro dei metalli pesanti.

Nell'alga verde *Stigeoclonium tenue* e in cellule giganti di *Chara corallina* (Silverberg , 1975) è stato, infatti, evidenziata una compartimentazione vacuolare del piombo e dello zinco, come uno dei meccanismi di detossificazione da metalli pesanti.

In letteratura, è noto che sono diversi i sistemi messi in atto dagli organismi vegetali, in risposta alla presenza di metalli pesanti. Quando la concentrazione citoplasmatica dei metalli pesanti supera alcuni livelli soglia, oltre la compartimentazione nei vacuoli, sono attivati anche i meccanismi di detossificazione di tipo enzimatico, per contrastare anche lo stress ossidativo.

A tal proposito, sono stati valutati i livelli di attività dell'ascorbato perossidasi. In cellule esposte a 250  $\mu$ M di cadmio è stato evidenziato un incremento dell'attività enzimatica del 20% rispetto alle cellule controllo, dopo solo 2 ore di esposizione, che raggiunge il suo valore massimo dopo 24 ore.

L'esposizione al piombo 250  $\mu$ M stimola, invece, l'attività dall'ascorbato perossidasi soltanto dopo 24 ore di esposizione. Il piombo sicuramente è più tollerato rispetto al cadmio da *C. sorokiniana*, risultando, tuttavia, altrettanto tossico dopo periodi di stress più lunghi.

In letteratura, è noto che negli organismi vegetali, una condizione di stress induce anche la sintesi di glutathione (GSH), un tripeptide contenente cisteina (Cys). A tal proposito, abbiamo voluto verificare se anche cellule trattate di *Chlorella sorokiniana* mostravano un'incremento della sintesi di cisteina. E' stata valutata, pertanto, l'attività dell'enzima che presiede la sintesi di questo amminoacido, ovvero l' O-acetil-serina(tiol)lasi (OASTL). L'attività dell'OASTL aumenta notevolmente, in cellule vegetali, in condizioni di stress nutrizionale, e soprattutto in carenza di zolfo (Carfagna et al., 2010). In *Chlorella sorokiniana*, esposte a cadmio si è osservato un incremento d'attività dopo solo 2 ore di esposizione che, dopo 24 ore era del 55% rispetto al controllo.



L'esposizione al piombo non provoca variazioni significative, perché probabilmente il piombo non raggiunge la cosiddetta *concentrazione soglia*, che induce l'aumento d'attività di questo enzima, ma che è soprattutto compartimentalizzato nei vacuoli come confermato dalla presenza di vacuoli densi osservati nei preparati al TEM. Il cadmio, al contrario, induce anche un'evidente risposta enzimatica, confermando ancora una volta che è meno tollerato del piombo da *Chlorella sorokiniana* (Fig. 3.12). L'attività dell'OASTL in *Chlorella sorokiniana* è fortemente regolata dallo stato nutrizionale solforato. Questo può giustificare la diminuzione della concentrazione delle proteine solubili registrata in seguito a esposizione a cadmio e piombo (Fig.3.8) , in quanto la cellula degrada le proteine per ricavare zolfo e quindi aumentare la sintesi dell'O-acetil-serina(tio)lasi. L'induzione dell'attività dell'OASTL, in seguito a esposizione a metalli pesanti, è stata osservata anche in *A. thaliana* (Barroso et al., 1995) e in alghe come *Chlaydomonas reinhardtii* (Ravina et al., 1999).

Dai risultati ottenuti in questo studio si è evidenziato che *Chlorella sorokiniana*, rispetto ad altri organismi è notevolmente resistente allo stress da metalli pesanti, in quanto riesce a mantenere comunque anche se bassa una attività di fotosintesi e una crescita lenta anche quando è

esposta a concentrazioni elevate di piombo e cadmio (250  $\mu\text{M}$ ). Inoltre, in *Chlorella sorokiniana*, l'esposizione al cadmio e il metabolismo dello zolfo, sono sicuramente correlati.

## *Bibliografia*

**Angel R.J.** Equations of state and thermodynamic proprieties of thermodynamic pyroxenes. *Journal of Geophysical Res.* (1994), 19:777-783

**Alloway, B.J.** Cadmium heavy metals in soil, 2<sup>nd</sup> ed. B.J. Alloway, ed (London:Chapman and Hall),(1995) pp. 122-151

**Andrade L. R., Salgado L. T., Farina M., Pereira S., Mourão Paulo A.S. and Filho G. M. A..** *Ultrastructure of acidic polysaccharidea from the cell walls of brown algae.* *Journal of Structural Biology* (2004), 145:216-225

**Aravind P., Prasad M.N.V..** *Zinc mediated protection to the conformation of carbonic anydrase in cadmium exposed Ceratophyllum demersum L.* *Plant Science* (2005), 169:245-254

**Asada K.** The role of ascorbate peroxidase and monodehydroascorbate reductase in H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> scavenging in plant In : Scandalios J.G. (ed) *Oxidative stress and the molecular biology of antioxidant defense.* Cold Spring Harbor laboratory Press (1997) New York

**Asada K. Takahashi M.** Production and scavenging of active oxygen in photosyntesis. In: Kyle D.J., Osmond C., Arntzen C.J. (eds) *Photoinhibition.* Elsevire, New York (1987), p.227

**Bajguz Andrej.** *Blockade of heavy metals accumulation in Chlorella vulgaris cells by 24-epibrassinolide.* Plant Physiol. Biochem. (2000), 38:797:801

**Barroso M., Nelson D.S. and Sztul E.** Transytosis-associated protein (TAP)/p115 is a general fusion factor required for binding of vesicles to acceptor membranes. PNAS (1995), 92:527-531

**Beck E. H., Fettig S., Knake C., Hartig K. and Bhattarai T..** *Specific and unspecific responses of plants to cold and drought stress.* J. Biosci. (2007), 32:501-510

**Briat J.F. and Lebrun M.** Plant responses to metal toxicity. Comptes Rendus Academie des Sciences de Paris (1999), 322:43-54

**Carfagna S., Vona V., Di Martino V., Esposito S., Rigano C.** Nitrogen assimilation and cysteine biosynthesis in barley evidence for root sulphur assimilation upon recovery from N-deprivation. Environ. Exp. Botany (2010), doi: 10.1016/j.envexpbot.2010.10.008

**Chang J.S., Law R. and Chang C.C.** Biosorption of lead, copper and cadmium by biomass of *Pseudomonas aeruginosa*. Water Res. (1997), 31:1651-1658

**Cho M.J., Wong J.H., Marx C., Jiang W., Lemaux P.G., and Buchanan**

**B.B.** Overexpression of thioredoxine *h lead* to enhancer activity of starch debranching enzyme (pullulanase) in barley grain. PNAS (1999), 25:14641-14646

**Choudhary M., Jetley U. K., Khan M. A., Zutshi S., Fatma T..** *Effect of*

*heavy metal stress on proline, malondialdehyde, and superoxide dismutase activity in the cyanobacterium Spirulina platensis-S5.*

Ecotoxicology and Environmental Safety (2007), 55:204-209

**Cobbett C. S..** *Phytochelatins and Their Roles in Heavy Metal*

*Detoxification.* Plant Physiology (2000), 123:825-832

**Cobbett C.S., May M.J., Howden R., Rolls B.** The glutathione-deficient,

cadmium-sensitive mutant, *cad2-1*, of *Arabidopsis thaliana* is deficient in  $\gamma$ -glutamylcysteine synthetase. The Plant Journal (1998), 16:73:78

**Das P., Samantaray S. and Rout G. R..** *Studies on cadmium toxicity in*

*plants: a review.* Environmental Pollution (1997), 98:29-36

**Delgado M., Digeriego M and Duardiola E.** Uptake of Zn, Cr and Cd by

water hyacinths. *Water Res.* (1993), 27:269-272

**De Pinto M. C., Tommasi F., De Gara L..** *Enzymes of the ascorbate biosynthesis and ascorbate-glutathione cycle in cultured cells of tobacco Bright Yellow 2.* Plant Physiol. Biochem. (2000), 38:541-550

**Devendra P. Singh and S. P. Singh.** *Action of heavy metals on hill acrivity and O<sub>2</sub> evolution in Anacystis nidulans.* Plant Physiol.(1987), 83:12-14

**Esquivel M.G., Ferreira R.B. Teixeira A.R.** Protein degradation in C<sub>3</sub> and C<sub>4</sub> plants subjected to nutrient starvation: particular reference to ribulose biphosphate carboxilase without plant death. J. Biol. Chem (1998),267:7253-7257

**Foyer C.H.** Free radical processes in plants.Biochem Soc. Trans (1996), 24:427:433

**Foyer C.H., Lelandais M. and Kunert K.J.** Photooxidative stress in plant. Physiologia Plantarum (1994), 92:696-717

**Franklin N.M.,Stauber J.L. Markich S.J. Lim R.P.** pH-dependent toxicity of copper and uranium to a tropical freshwater alga (*Chlorella sp.*). Aquat. Toxicol. (2000), 48:275-289

**Fridovich I.** Superoxide anion radical, superoxide dismutase and related matters. J. Biol. Chem. (1997), 250:18515-18517

**Genter R.B.** Ecotoxicology of inorganic chemical stress to algae. Algal ecology. Praha: Academic Press. pp.403-468

**Gupta Anu and Singhal Gauri S..** *Inhibition of PSII activity by copper and effect on spectral properties on intact cells in Anacystis nidulans.* Environmental and Experimental Botany (1995), 35:435-439

**Gupta V. K., Shrivastava A. K. and Jain Neeraj.** *Biosorption of chromium(VI) from aqueous solutions by green algae Spirogyra species.* Wat. Res.(2001), 35:4085-2001

**Hall A.** Copper accumulation in copper-tolerant and non-tolerant populations of the marine fouling alga, *Ectocarpus siliculosus* (Dillw) Lyngbye. Botanica Marina (1981), 29:223-228

**Hall J.L.** Cellular mechanisms for heavy metal detoxification and tolerance. Journal of Experimental Botany. (2002), 53:1-10

**Halliwell. B.** Oxidative damage , lipid peroxidation and antioxidant protection in chloroplast. Chem and Physics of Lipids (1987), 44:327-340

**Hamdy A.A..** *Biosorption of Heavy metals by Marine Algae.* Current Microbiology (2000), 41:232-238



**Hammond-Kosak K.E. and Jones J.D.G** Resistance gene-dependent plant defense response. *Plant Cell* (1996), 8:1773-1791

**He Z., Wang Z.Y., Li J., Zhu Q., Lamb C., Ronald P and Chory J.** perception of brassinosteroids by the extracellular domain of the receptor kinase BRI1. *Science* (2000), 288:2360-2363

**Hodges, D.M., DeLong, J.M, Forney, C.F. and Prange, R.K.** Improving the thiobarbituric acid-reactive-substances assay for estimating lipid peroxidation in plant tissues containing anthocyanin and other interfering compounda. *Planta* (1999), 207:604-611

**Hodges D.M. and Forney.** The effect of ethylene depressed oxygen and elevated carbon dioxide on antioxidant profiles of senescing spinach leaves. *Journal of Exp. Botany* (2000), 51:645-655

**Jervis L., Rees-Naesborg R. and Brown M.** Biochemical responses of the marine macroalgae *Ulva lactuca* and *Fucus vesiculosus* to cadmium and copper from sequestration to oxidative stress. *Biochemical Society Transaction* (1997), 25:635

**Kaduková J., Virčíková E..** *Comparison of differences between copper bioaccumulation and biosorption.* *Enviromment International* (2004), 31: 227-232

**Knauer K., Ahner B., Xue H.B., Sigg L.** Metal and phytochelatin content in phytoplankton from freshwater lakes with different metal concentration. *Environ. Toxicol. Chem* (1998), 17:2444-2452

**Klimmek S., Stan H. J., Wilke A., Bunke G. and Buchholz R..** *Comparative Analysis of the Biosorption of Cadmium, Lead, Nickel and Zinc by Algae.* *Environ. Sci. Technol.* (2001), 35:4283-4288

**Knauer K., Behra R. and Sigg L..** *Adsorption and uptake of copper by the green alga Scenedesmus subcapitatus (Chlorophyta).* *J. Phycol.* (1997), 33:596-601

**Knauer K., Behra R., Sigg L.** Effects of free  $\text{Cu}^{2+}$  an  $\text{Zn}^{2+}$  ions on growth and metal accumulation in freshwater algae. *Environ. Toxicol. Chem.*(1997), 16:220-229

**Kneer R., and Zenk M.H.** Phytochelatins protect plant enzymes from heavy metal poisoning. *Phytochemistry* (1992), 31:2663-2667

**Küpper H., Šetlik I., Spiller M., Küpper F. C. and Prášil O..** *Heavy metal-induced inhibition of photosynthesis: targets of in vivo heavy metal chlorophyll formation.* J. Phycol. (2002), 38:429-441

**Lappartient A.G., and Touraine B.** Demand-driven control of root ATP sulfurylase activity and  $\text{SO}_4^{2-}$  uptake in intact canola Plant Phys.(1996), 111:147-152

**Lappartient A.G.** Glutathione-mediated regulation of ATP sulfurylase activity  $\text{SO}_4^{2-}$  uptake, and antioxidative stress response in intact canola. Plant Phys. (1997), 114:177-183.

**Leusch A., Zdenek R. Holan and Bohumil Volesky.** *Biosorption of heavy metals (Cd, Cu, Ni, Pb, Zn) by chemically-reinforced biomass of marine algae.* J. Chem. Tech. Biotechnol. (1995), 62:279-288

**Lyngby J.E. and Brix H.** The uptake of heavy metals in eelgrass *Zostera marina* and their effect on growth. Ecological Bulletin (1984), 36:81-89

**Lobban C.S., Harrison P.J., Duncan M.J.** The physiological ecology of seaweeds. UK Cambridge University Press (1985), pp.123-131

**Lobban C.** and Harrison P. Seaweed Ecology and Physiology: Cambridge University Press. New York 1984

**Macfarlane G. R. and Burchett M. D..** *Photosynthetic pigments and peroxidase activity as indicators of heavy metal stress in the Grey Mangrove, Avicennia marina (Forsk.) Vierh.* Marine Pollution Bulletin (2001), 42:233-240

**Malea P. Haritonidis S. and Kevrekidis T.** Seasonal and local variation of metal concentrations in the seagrass *Posidonia oceanica* (L) Delile in the Antikyra Gulf, Greece. The Science of the Total Env. (1994), 153:225-235

**Malea P. and Haritonidis S..** *Seasonal accumulation of metal by red alga Gracilaria verrucosa (Huds.) Papens. From Thermaikos Gulf, Greece.* Journal of Applied Phycology (1999), 11:503-509

**Metha S. K. and Gaur J.P..** *Heavy-metal.induced proline accumulation and its role in ameliorating metal toxicity in Chlorella vulgaris.* New Phytol. (1999), 143:253-259

**Moenne A.** Eucaryotic metallothioneins: protein structure gene regulation on copper homeostasis. Cahiers Biologie Marine (2001), 42:125-135

**Müller J. L.-, Krishna P. and Forreiter C..** *A glucosinolate mutant of Arabidopsis is thermosensitive and defective in cytosolic Hsp90 expression after heat stress.* Plant Physiology (2000), 123:949-958

**Nishikawa K., Yamakoshi Y., Uemura I., Tominaga N. .** *Ultrastructural changes in Chlamydomonas acidophila (Chlorophyta) induced by heavy metals and polyphosphate metabolism.* FEMS Microbiology Ecology (2003), 44:253-259

**Nocito F., Lancilli C., Giacomini B., Sacchi G. A..** *Sulfur Metabolism and Cadmium Stress in Higher Plants.* Plant Stress (2007).

**Noctor G. and Foyer C.H.** Ascorbate and Glutathione : keeping oxygen under control. Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol (1998), 49:249-279

**Okamoto O. K., Pinto E., Latorre L. R., Bechara E. J. H., Colepicolo P..** *Antioxidant modulation in response to metal-induced oxidative stress in algal chloroplast.* Arch. Environ. Contam. Toxicol. (2001), 40:18-24

**Okamodo O.K., Asano C.S., Aidar E., Colepicolo P.** Effects of cadmium on growth and superoxide dismutase activity of the marine microalga Tetraselmis gracilis. J. Phycol. (1996), 32:74-79

**Okamura H.**, Aoyanne I. Interactive toxic effect and distribution of heavy metals in phytoplankton. *Environ Toxicol and Water Quality* (1994), 9:7-15

**Ouzounidou G., Moustakas M, Eleftheriou E. P..** *Physiological and Ultrastructural effects of cadmium on whet (Triticum aestivum L.) Leaves.* Arch. Environ. Contam. Toxicol. (1997), 32:154-160

**Pairat Kaewsarn.** *Biosorption of copper(II) from aqueous solution by pre-treated biomass of marine algae Padina sp.* Chemosphere (2002), 47:1081-1085

**Payne S.G. and Vowels J.A** dileucine-like sorting signal direct transport into an AP-3-dependent, clathrin-independent pathway to the yeast vacuole. *The EMBO Journal* (1998), 17:2482-2493

**Pastori G., Foyer C.H. and Mullineaux P.** Low temperature-induced changes in the distribution of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> an antioxidant between the bundle sheath on mesophyll cells of maize leaves. *Journal of Experimental Botany* (2000), 51:107-113

**Pawlik.Skowrońska B..** *Resistance, accumulation and al location of zinc in two ecotypes of the green alga Stigeoclonium tenue Kütz. Coming*

*from habitats of different heavy metal concentrations. Aquatic Botany* (2003), 75:189-198

**Pawlik-Skowronska B.** Phytochelatin production in freshwater algae *Stigeoclonium* in response to heavy metals contained in mining water, effects of some environmental factors. *Aquat. Toxicol.* (2001), 52:241-249

**Pawlik-Skowronska B.** correlations between toxic Pb effects and production of Pb-induced thiol peptides in the microalga *Stichococcus bacillaris* *Environ. Pollut.* (2002), 119:119-127

**Pinto E., Catalani L.H. Lopes N.P., Di Mascio P., Colepicolo P.** Piridinín as the major biological carotenoid quencher of singlet oxygen in *Gonyaulax polyedra*. *Biochem. Biophys Res. Commun.*(2000), 268:496-500

**Pinto Jr. O. P. I.R.C.A., Daniz J.H., Cazeta F.A., Charchiglia L.C.L. and Carvalho A.M.** A seven-year study about the negative cloud-to-ground lightning flash characteristics in the southeastern. Brazil. *J. Atmos. Soler. Terr. Phys.* (2003), 65:739-748

**Rarkevicius N., Correa J. A. and Moenne A..** *Copper accumulation, synthesis of ascorbate and activation of ascorbate peroxidase in*

*Enteromorpha compressa* (L.) Grev. (Chlorophyta) from heavy metal-enriched environments in northern Chile. *Plant, Cell and Environment* (2003), 26:1599-1608

**Romera E., Gonzàles F., Ballester A., M. Blàzquez L., Munoz J. A.** *Comparative study of biosorption of heavy metals using different types of algae*. *Bioresource Technology* (2007), 98:3344-3353

**Ralph P.J., Burchett M.D.** *Photosynthetic response of Halophila ovalis to heavy metal stress*. *Environmental Pollution* (1998), 103:91-101

**Rai L.C., Gaur M.J., Po H.D.** *Phycology and heavy metal pollution*. *Biol. Rev.* (1981), 56:99-151

**Rauser W.** *Phytochelatins*. *Annu. Rev. Biochem.* (1990), 59:61-86

**Rice-Evans C.A., Miller N.J., Paganga G.** *Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids*. *Free Radic. Biol. Med.* (1996), 20:933-956

**Salt D.E., Prince R.C., Pickering J.I., Raskin I.**, 1995. *Mechanism of cadmium mobility and accumulation in Indian mustard*. *Plant Physiology* 109, 1427-1433.



**Sandau E., Sandau P., Pulz O.** *Heavy Metal Sorption by Microalgae*. Acta Biotechnol. (1996), 16:227-235

**Sandau E., Sandau P., Pulz O., Zimmermann M.** Heavy metal sorption by marine algae and algal by-products. Acta Biotechnol. (1996), 16:103-119

**Sayre T..** *Molecular Mechanisms of Proline-Mediated Tolerance to Toxic Heavy Metals in Transgenic Microalgae*. The Plant Cell (2002), 14:2837-2847

**Santità di Toppi L., Pawlik-Skowrońska B., Vurro E., Vattuone Z., Kalinowska R., Restivo F.M., Musetti R., Skowroński T..** *First and second line mechanisms of cadmium detoxification in the lichen photobiont Trebouxia impressa (Chlorophyta)*. Environmental Pollution (2008), 151:280-286

**Sarabjeet Singh Ahluwalia, Dinesh Goyal.** *Microbial and plant derived biomass for removal of heavy metals from wastewater*. Bioresource Technology (2007), 98:2243-2257

**Sauser K., Liu J.K. Wong T.Y.** Identification of a copper-sensitive ascorbate peroxidase in the unicellular green alga *Selenastrum capricornutum*. Biometals (1997), 10:163-168

**Schat H., Llugany M., Voiis R., Whitaker J. H. and Bleeker P. M..** *The role of phytochelatins in constitutive and adaptive heavy metal tolerances in hyperaccumulator and non-hyperaccumulator metallophytes.* Journal of Experimental Botany (2002), Vol.53 n° 379:2381-2392

**Schiewer S. M., Wong H..** *Ionic strength effects in biosorption of metals by marine algae.* Chemosphere (2000), 41:271-282

**Shanti S. Sharma and Karl-Josef Dietz.** *The significance of amino acids and amino acid-derived molecules in plant responses and adaptation to heavy metal stress.* Journal Of Experimental Botany (2006), 4:711-726

**Shah K., Kumar R. G., Verma S., Dubey R. S..** *Effect of cadmium on lipid peroxidation, superoxide anion generation and activities of antioxidant enzymes in growing rice seedlings.* Plant Science (2001), 161:1135-1144

**Shigeru Shigeoka, Takahiro Ishikawa, Masahiro Tomoi, Yoshiko Miyagawa, Toru Takeda, Yukinori Yabuta and Kazuya Yoshimura.** *Regulation and function of ascorbate peroxidase isoenzymes.* Journal of Experimental Botany (2002), 53:1305-1319

**Sies H.** Glutathione and its role in cellular function. Free Radic Biol Med. (1999), 27:916-921

**Silverberg B.A.** Cadmium-induced ultrastructural changes in mitochondria of freshwater green algae. *Phycologia* (1976),15:155-159

**Silverberg B.A.** Ultrastructural localization of lead in *Stigeoclonium tenue* (*Chlorophyceae, Ulotrichales*) as demonstrated by cytochemical and X-ray microanalysis. *Phycologia* (1975), 14:265-274

**Skowronski T., Szubinska S., Pawlik B., Jakubowski M.** The influence of pH on cadmium toxicity to the green alga *Stichococcus* and on the cadmium forms present in the culture medium. *Environ. Pollut.* (1991), 74:89-100

**Smirnoff N.** Ascorbic acid metabolism and function of a multi-facetted molecules. *Current Opinion in Plant Biology* (2000), 3:229-235

**Smirnoff N., Conklin P.L. and Loewus F.A.** Biosynthesis of ascorbic acid in plants: a renaissance. *Annual review of Plant Physiology on Plant Molecular Biology* (2001), 52:437-467

**Smirnoff N.,Cumbes Q.J.** Hydroxyl radical scavenging activity of compatibles solutes. *Phytochemistry* (1989), 28:1057-106

**Soldo D., Behra R..** *Long-term effects of copper on the structure of freshwater periphyton communities and their tolerance to copper, zinc, nickel and silver.* Aquatic Toxicology (2000), 47:181-189

**Stauber J.L. and Florence T.M..** *Mechanism of toxicity of zinc to the marine diatom Nitzschia closterium.* Marine Biology (1990), 105:519-524

**Stiborová M., Ditrichová M. and Březinová A..** *Effect of Heavy Metal Ions on Growth and Biochemical Characteristics of Photosynthesis of Barley and Maize Seedlings.* Biologia Plantarum (1987), 29:453-467

**Surasak Siripornadulsil, Samuel Traina, Desh Pal S. Verma and Richard Thomas A. Davis, Bohumil Volesky, Alfonso Mucci.** *A review of the biochemistry of heavy metal biosorption by brown algae.* Water Research (2003), 37:4311-4330

**Taiz L. and Zeiger E.** Plant Physiology (1998) 2<sup>nd</sup> edn pp. 251-286. Sinauer, Sunderland, MA, USA

**Tripathi B.N , Gaur J.P.** 2004. Relationship between copper-and zinc induced oxidative stress and proline accumulation in *Scenedesmus* sp. Planta 219, 397-404.

**Tripathi B.N. and Pratibha Srivastava.** *Presence of stable active oxygen scavenging enzymes superoxide dismutase, ascorbate peroxidase and catalase in a desiccation-tolerant cyanobacterium Lyngbya arboricola under dry state.* Current science (2001), Vol.81 n° 2.

**Tseng Y.T., Tessema G.X. and Skove M.J.** Separation of the threshold fields for charge-density-wave motion in NbSe<sub>3</sub> using elastic strain. Phys. Rev. B. (1993), 48:4871-4874

**Topcuoğlu S., Güven K.C., Balkis N., Kirbaşoğlu C..** *Heavy metal monitoring of marine algae from the Turkish Coast of the Black Sea, 1998-2000.* Chromosphere (2003), 52:1683-1688

**Vasconcelos M.T. S.D., Leal M. F C..** *Antagonistic interactions of Pb and Cd on Cu uptake, growth inhibition and chelator release in the marine algae Emiliana huxleyi.* Marine Chemistry (2001), 75:123-139

**Veglio F., Beolchini F.** Removal of metals by biosorption: a review. Hydrometallurgy (1997), 44:301-316

**Vinit-Dunand F., Ehan D., Alaoui-Sosse and Badot P.M.** Effects of copper on growth and on photosynthesis of mature and expending leaves in cucumber plant. Plant Science (2002), 163:53-58

**Wong S.L., Nakamoto L., and Wainwright J.F.** Identification of toxic metals in affected algal cells in assays of wastewaters. *J. Appl. Phycol.* (1994),6:405-414

**Xue H.-B., Stumm W. and Sigg L..** *The binding of heavy metals to algal surfaces.* *Wat. Res.* (1988), 22:917-926

**Yew-Hoong K. Gin, Tang Y.Z, Aziz M. A..** *Deivation and application of a new model for heavy metal biosorption by algae.* *Water Research* (2002), 36:1313-1323

**Zhang L., Happe T., Melis A.** Biochemical and morpholocal characterization of sulfur deprived and H<sub>2</sub>-producing *Clamidomonas reinhardtii* (green alga). *Planta* (2001), 214:552:561

**Zalups R.K.** and Ahmad S. Molecular handling of cadmium in transporting epithelia. *Toxicology and applied pharmacology* (2003), 186:163-168

**Zangh W. and Majidi V.** Monitoring of the cellular response to exposure to *Stichococcus bacillaris* several different metals using in Vivo 31P NMR Spectroscopic an other technique. *Environ Sci Technol.* (1994), 28:1577-1581